(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012 년 9 월 13 일 (13.09.2012)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2012/121577 A2

(51) 국제특허분류:
C07K 19/00 (2006.01) *C12N 5/074* (2010.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2012/001795

(22) 국제출원일: 2012 년 3 월 12 일 (12.03.2012)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2011-0021526 2011 년 3 월 10 일 (10.03.2011) KR

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **이화여자대학교 산학협력단 (EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION)** [KR/KR]; 서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교), 120-750 Seoul (KR).

(72) 발명자; 겸
(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **이승진 (LEE, Seung Jin)** [KR/KR]; 서울특별시 영등포구 국제금융로 86, 102-2804 (여의도동, 롯데캐슬아이비), 150-762 Seoul (KR). **정미라 (JUNG, Mi Ra)** [KR/KR]; 서울특별시 은평구 증산로 5 길 36-15, 201 (증산동, 대도빌라), 122-100 Seoul (KR). **심인경 (SHIM, In Kyung)** [KR/KR]; 서울특별시 마포구 토정로 167, 103-202 (창전동, 서강해모로아파트), 121-190 Seoul (KR). **박윤정 (PARK, Yoon Jeong)** [KR/KR]; 서울특별시 구로구 새말로 31,110-402 (구로동, 롯데아파트), 152-770 Seoul (KR). **김종석 (KIM, Jong Seok)** [KR/KR]; 전라북도 전주시 완산구 유연로 217, 103-906 (효자동 3 가, 호반베르디움), 560-241 Jeollabuk-do (KR). **양영일 (YANG, Young Il)** [KR/KR]; 부산광역시 남구 수영로 39 번나길 22 (문현동), 608-040 Busan (KR). **정혜진 (CHUNG, Hye Jin)** [KR/KR]; 서울특별시 마포구 성미산로 87, 503 (성산동), 121-251 Seoul (KR).

(74) 대리인: **손민 (SON, Min)**; 서울 강남구 테헤란로 87 길 36, 6 층 한얼국제특허사무소(삼성동, 도심공항타워), 135-973 Seoul (KR).

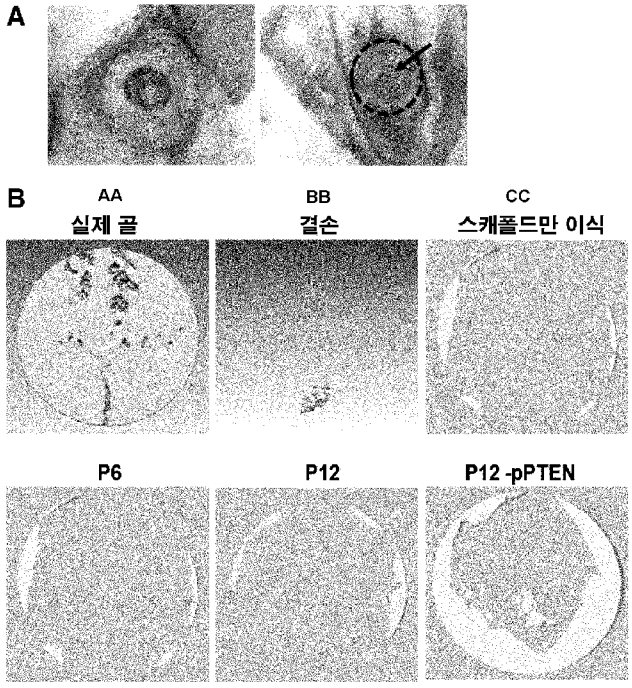
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION FOR STRENGTHENING TISSUE REGENERATIVE POWER OF STEM CELL HAVING PTEN

(54) 발명의 명칭 : ＰＴＥＮ을 포함하는 줄기세포의 조직 재생능 강화용 조성물

[Fig. 13]



(57) **Abstract**: The present invention relates to a composition for strengthening the tissue regenerative power of a stem cell, the composition including PTEN, a kit for tissue regeneration, method for preparing a stem cell having strengthened tissue regenerative power using PTEN, and a method for regenerating a tissue. In addition, the present invention relates to a method for restoring a stem cell to a previous passage status using PTEN, a method for delaying the aging of a stem cell, and a composition for rejuvenating a stem cell, the composition including PTEN. The present invention resolves the problem of the decrease in the tissue regenerative power, auto regenerative power, and differentiation potency, which occurs due to an increase in the passage frequency, and secures multiple high quality stem cells outside the body.

(57) **요약서**: 본 발명은 PTEN 을 포함하는 줄기세포의 조직 재생능 강화용 조성물, 조직 재생용 키트, PTEN 을 이용하여 조직 재생능이 강화된 줄기세포의 제조방법, 및 조직 재생 방법에 관한 것이다. 또한, PTEN 을 이용하여 줄기세포를 이전 계대 배양 상태로 회복시키는 방법, 줄기세포의 노화를 지연시키는 방법, 및 PTEN 을 포함하는 줄기세포의 회춘 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 계대 배양 횟수 증가에 따라 나타나는 줄기세포의 조직 재생능, 자가재생능 및 분화능 저하 문제 등을 해결하여, 생체 외에서도 양질의 줄기세포를 다량으로 확보할 수 있다.

WO 2012/121577 A2

CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: PTEN을 포함하는 줄기세포의 조직 재생능 강화용 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 PTEN을 포함하는 줄기세포의 조직 재생능 강화용 조성물, 조직 재생용 키트, PTEN을 이용하여 조직 재생능이 강화된 줄기세포의 제조방법, 및 조직 재생 방법에 관한 것이다. 또한, PTEN을 이용하여 줄기세포를 이전 계대 배양 상태로 회복시키는 방법, 줄기세포의 노화를 지연시키는 방법, 및 PTEN을 포함하는 줄기세포의 회춘 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[2] 현대 사회에 있어서, 줄기세포의 활용은 미래 유망 기술로써 각광받고 있으며, 각종 난치병의 치료를 비롯한 의료계, 화장품 업계 등 다양한 산업분야에서 그 활용이 시도되고 있는 실정이다.

[3] 줄기세포란 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화되는 능력을 갖는 세포를 말하며, 만능 줄기세포(totipotent stem cell), 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cell), 다분화능 줄기세포(multipotent stem cell)로 분류할 수 있다. 다분화능 줄기세포(multipotent stem cell)는 세포가 포함되어 있는 조직 및 기관에 특이적인 세포로만 분화할 수 있는 줄기세포로서, 태아기, 신생아기, 및 성체기의 각 조직 및 장기의 성장과 발달은 물론 성체조직의 항상성 유지와 조직손상시 재생을 유도하는 기능에 관여한다. 조직 특이적 다분화능 줄기세포들(tissue specific multipotent stem cells)을 총칭하여 성체 줄기세포라 한다. 성체 줄기세포는 인체의 각종 장기에 이미 존재하는 세포를 채취하여, 줄기세포로 발생시킨 것으로 특정 조직으로만 분화되는 특징이 있다. 그러나 최근에는 성체 줄기세포를 이용, 간세포 등 다양한 조직으로 분화시키는 실험이 성공을 거두고 있어 주목된다.

[4] 상기 다분화능 줄기세포는 성체 골수에서 최초로 분리되었고, 그 후 다른 여러 성체 조직, 예컨대 피부, 지방, 혈관, 근육 및 뇌로부터도 확인되었다. 그러나, 줄기세포는 골수와 같은 성체 조직 내에 매우 드물게 존재하며, 분화유도 없이는 배양하기 어렵기 때문에, 특이적으로 스크리닝된 배지들이 없으면 배양하기 어렵다. 즉, 줄기세포는 체내에서 분리하여 체외에서 보존하기가 매우 어렵다는 단점이 있다. 이러한 이유로, 성체 줄기세포를 산업적으로 이용하기 위해서는 대량으로 성체 줄기세포를 배양할 수 있는 방법이 요구된다.

[5] 그러나, 줄기세포를 추출하여 체외에서 (in vitro) 반복적으로 증식 배양시키면, 줄기세포는 자가재생능, 분화능, 및 조직 재생능의 저하를 초래하고, 증식 지연, 세포 크기 증가, 염색체 이상 및 분자수준의 변화를 일으키면서 노화되게 된다. 이러한 변화는 줄기세포를 사용한 임상 치료 결과에 영향을 줄 수 있다. 따라서,

줄기세포를 이용한 질병 치료의 활용도를 높이기 위해서는 생체 내 뿐 아니라 생체 외에서 줄기세포의 자가재생능, 분화능, 및 조직 재생능 등을 유지시키거나, 증식이 반복됨에 따라 저하된 자가재생능, 분화능, 및 조직 재생능 등을 이전 배양 상태로 회복시켜주는 기술의 개발이 필요하다.

[6]

[7] 한편, PTEN (Phosphatase and Tensin Homologue deleted from chromosome ten)은 내인성 지질 포스파타제로서, 403개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 분자량은 47,000이고 많은 세포주에서 발현된다. PTEN은 세린/트레오닌 포스파타제 및 티로신 포스파타제 활성(tyrosine phosphatase)을 갖는 이중 특이성(dual specificity) 단백질 포스파타제의 기능을 가지며, 포스포이노시티드 3-포스파타제(phosphoinositide 3-phosphatase) 및 이노시톨 포스페이트 3-포스파타제(inositol phosphate 3-phosphatase)의 기능을 나타내는 지질 포스파타제로서의 기능도 할 수 있다(myers MP, Stolarov JP, Eng C, Li J, Wang SI, Wigler MH, Parsons R, Tonks NK, P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997;94:9052-9057).

[8] 또한, PTEN은 종양 억제 유전자로서, 세포 주기의 조절에 관여하며, 암세포 증식(cell proliferation), 이동(cell migration), 성장, 침입(cell invasion) 등을 억제하는 것으로 알려져 있다.

[9] 아울러, 신경 줄기/전구세포에서 PTEN의 제거가 G0 세포 주기 탈출 및 자기 재생 능력을 향상시킨다는 사실이 보고된 바 있으며(Matthias Groszer, Rebecca Erickson, Deirdre D. Scripture-Adams, Joseph D. Dougherty, Janel Le Belle, Jerome A. Zack, and Hong Wu, PTEN negatively regulates neural stem cell selfrenewal by modulating G0-G1 cell cycle entry, PNAS, 2006;103:111-116), 신경 줄기세포 뿐 아니라 전립선 줄기세포에서도 PTEN의 결손은 줄기세포의 세포 증식을 증가시킬 수 있다고 보고된 바 있다. 또한, 미국 공개 특허 제2007-0297985호는 PTEN의 활성을 억제하는 물질을 조골세포에 도입하여 골형성이 증가될 수 있다고 개시하고 있으나, PTEN을 직접 줄기세포에 도입하여 계대 배양에 따른 줄기세포의 기능 저하를 회복시키거나 줄기세포의 조직 재생능을 증가시키는 연구는 아직 이뤄지지 않았다.

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[11] 본 발명자들은 계대 배양 횟수 증가에 따라 나타나는 줄기세포의 조직 재생능, 자가재생능 및 분화능 저하 문제를 해결하여, 생체 외에서도 양질의 줄기세포를 다량으로 확보하기 위한 방법을 확보하고자 예의 노력한 결과, 계대수 증가에 따라 이미 분화능 또는 조직 재생능 등이 저하된 줄기세포에 PTEN을 도입하면,

줄기세포의 분화능이 이전 계대 배양 상태로 회복되고, 계대수 증가에 따라 저하된 조직 재생능이 개선되며, 초기 계대의 줄기세포보다 조직 재생능이 강화되는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

[12] 상기 과제를 해결하기 위해 본 발명의 목적은 PTEN 유전자 또는 PTEN을 포함하는, 줄기세포의 조직 재생능 강화용 조성물을 제공하는 것이다.

[13] 본 발명의 다른 목적은 줄기세포에 PTEN 유전자 또는 PTEN을 도입하는 단계를 포함하는, 조직 재생능이 강화된 줄기세포의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[14] 본 발명의 또 다른 목적은 플라스미드 PTEN 및 PTD의 콘쥬게이트, 및 줄기세포를 포함하는 조직 재생용 키트를 제공하는 것이다.

[15] 본 발명의 또 다른 목적은 줄기세포가 부착된 조직 재생 지지체를 조직 재생이 필요한 부위에 적용시키는 단계를 포함하는 조직 재생방법으로서, 상기 줄기세포는 PTEN 유전자 또는 PTEN이 도입된 것인 조직 재생방법을 제공하는 것이다.

[16] 본 발명의 또 다른 목적은 PTEN 유전자 또는 PTEN을, 시험관에서(in vitro) 계대 배양된 줄기세포에 도입하는 단계를 포함하는, 줄기세포를 이전 계대 배양 상태로 회복시키는 방법을 제공하는 것이다.

[17] 본 발명의 또 다른 목적은 PTEN 유전자 또는 PTEN을 포함하는, 줄기세포의 회춘 조성물을 제공하는 것이다.

[18] 본 발명의 또 다른 목적은 PTEN 유전자 또는 PTEN을 시험관에서(in vitro) 계대 배양된 줄기세포에 도입하는 단계를 포함하는, 줄기세포의 노화 지연방법을 제공하는 것이다.

[19] 본 발명의 또 다른 목적은 PTEN 유전자 또는 PTEN을 포함하는, 줄기세포의 노화 지연용 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 효과

[20] 본 발명은 계대수 증가에 따라 이미 자가재생능, 분화능 및 조직 재생능 등이 저하된 줄기세포에 PTEN을 도입함으로써, 계대 초기의 줄기세포 상태 즉, 자가재생능, 분화능, 및 조직 재생능이 우수한 상태로 줄기세포의 기능을 회복시켜, 체외에서도 양질의 줄기세포를 다량으로 확보할 수 있고, 장기간 보존할 수 있는 효과를 가진다.

[21] 특히, 본 발명에서는 계대수 증가에 따라 조직 재생능이 감소된 줄기세포에 PTEN을 도입함으로써, 초기 계대의 줄기세포보다 줄기세포의 조직 재생능을 강화시켜줄 수 있는 바, 성체 줄기세포를 이용한 우수한 조직 치료가 가능하다.

도면의 간단한 설명

[22] 도 1은 PTEN 및 CPP 콘쥬게이트를 줄기세포에 도입한 후, 면역형광 염색을 통하여 PTEN이 세포 내 발현됨을 도시한 것이다. pPTEN-CPP 접합체를 도입한

세포 핵에서 PTEN이 강하게 발현되는 것이 관찰되었다. (배율: x400; pPTEN, 플라스미드 PTEN; CPP, cell-permeable peptide; DAPI, 4'6'-diamidino-2-phenylindole)

[23] 도 2는 지방 유래 줄기세포(ASC)에서 β-갈락토시다아제 발현을 나타낸 것이다. 계대수가 증가함에 따라 β-갈락토시다아제 염색 양성 세포가 증가하는 것이 관찰되었으며, P10 부터는 pPTEN이 도입된 ASC에서 도입되지 않은 ASC에 비해 β-갈락토시다아제 발현되는 세포의 수가 두드러지게 감소하는 것이 확인되었다(A: PTEN을 도입하지 않은 대조군, B: PTEN을 도입한 군).

[24] 도 3은 계대 배양에 따른 ASC의 세포 모양 변화를 나타낸 것이다. 계대수 증가에 따라 ASC는 모양이 커지면서 납작해지고, 길게 뻗어나가는 형태 변화가 일어났다. PTEN이 도입된 ASC에서 상기의 현상이 PTEN이 도입되지 않은 ASC 보다 현저히 감소하였다. (A: PTEN을 도입하지 않은 대조군, B: PTEN을 도입한 군).

[25] 도 4는 계대 배양에 따른 ASC의 세포 크기 변화를 나타낸 것이다. 계대수 증가에 따라 ASC의 세포 크기는 증가하였으나, PTEN이 도입된 ASC는 PTEN이 도입되지 않은 ASC보다 세포 크기 증가폭이 감소되는 것이 관찰되었다(A: PTEN을 도입하지 않은 대조군, B: PTEN을 도입한 군).

[26] 도 5는 PTEN의 도입 여부에 따른, 텔로머라제 활성 변화를 나타낸 것이다.

[27] 도 6은 계대 배양에 따른 ASC 증식률 변화를 나타낸 것이다. PTEN이 도입된 ASC 집단이 PTEN이 도입되지 않은 ASC 집단보다 증식률 및 증식기간이 높음이 관찰되었다.

[28] 도 7의 (A)는 초기 계대와 후기 계대에서의 지방세포 분화 정도를 나타낸 것이다. 현미경사진은 배양된 ASC에서 오일 레드-O 염색된 지질입자를 보여주고 있다. P6의 ASC와 P12 ASC에 커다란 차이를 보인다. pPTEN을 도입한 P12 ASC에서는 도입되지 않은 P12 ASC에 비해 지방 소적들을 더 많이 가지고 있으며, pPTEN을 도입한 P12 ASC이 P6 ASC의 분화능 상태로 회복되었다(배율 : x20. 에러 바는 평균±표준편차를 나타낸다(n=4)).

[29] (B)는 초기 계대와 후기 계대에서의 골세포 분화를 나타낸 것이다. 현미경사진은 배양된 ASC에서 칼세인에 의해 염색된 칼슘 포스페이트(calcium phosphate)를 보여주고 있다. P6의 ASC와 P12 ASC간에 커다란 차이를 보인다. pPTEN을 도입한 P12 지방 유래 줄기세포에서는 도입되지 않은 P12 지방 유래 줄기세포에 비해 칼슘 포스페이트를 더 많이 가지고 있으며, PTEN을 도입한 P12 ASC이 P6 ASC의 분화능 상태로 회복되었다(배율: x20. 평균±표준편차를 나타낸다(n=4)).

[30] 도 8은 PTEN 도입 여부, 및 계대 초기 및 후기에 따라 연골조직 생성 마커의 발현 정도를 역전사 PCR로 분석한 결과를 나타낸 것이다(P7: PTEN 7p, C7: 대조군 7p, P12: PTEN 12p, C12: 대조군 12p).

[31] 도 9는 PTEN 도입 여부, 및 계대 초기 및 후기에 따라 연골 생성 분화 유도 2주

후 콜레간 타입 II, aggrecan 및 COMP 유전자 발현 양상을 나타낸 것이다(n=4).

[32] 도 10은 PTEN이 도입된 ASC 및 PTEN이 도입되지 않은 ASC에서, 6계대에서 11계대 동안 세포사멸 관련 단백질의 발현 변화를 나타낸 것이다("P"는 PTEN 도입 지방 유래 줄기세포).

[33] 도 11은 PTEN이 도입되지 않은 대조군 및 PTEN을 도입한 ASC의 세포사멸 관련 단백질 양상에 대한 비교 그래프이다.

[34] 도 12(A)의 a는 강하게 상호 연결된 PLLA 섬유 3D 지지체의 SEM 영상을 나타낸 것이다. b는 시딩 후 7일째 지지체에 부착한 ASC를 나타내 것이다. 부착된 ASC는 광범위한 원형질 확장을 보였다. c는 ASC를 지지체 섬유에 시딩한 후 7일차에 헤마톡시린 및 에오신(H&E) 염색을 통하여 세포가 침투된 것을 보여준 것이다. 보라색으로 염색된 부위는 지지체위 또는 내부에 있는 세포의 핵을 나타낸다. 지지체 내의 큰 공극은 지방 유래 줄기세포로 완전히 채워져 있었다.

[35] (B)는 두개골 결손 백서에 ASC를 포함하는 PLLA 지지체를 이식시키고 4주 후의 조직을 나타낸 것이다. 아무런 처리 없는 지지체, P6 ASC를 심은 지지체, P12 ASC를 심은 지지체, 또는 pPTEN을 유입한 P12 ASC를 심은 지지체를 이식시킨 경우 결손부위에 대한 이미지이다. 이미지는 결손 여백부분(중단 이미지)과 결손 중앙부분(하단 이미지)을 보여준다(배율: (상단) x2, (중단) x20, (하단) x40. 축약: HE, 헤마톡시린-에오신; B, 골; S, 지지체 또는 세포를 심은 지지체)

[36] 도 13은 두개골 결손 백서의 micro-CT 3D 복원 이미지를 나타낸 것이다. 두개골 결손 백서에 지지체, P6 ASC를 심은 지지체, P12 ASC를 심은 지지체, 또는 pPTEN을 유입한 P12 ASC를 심은 지지체를 이식하였을 때의 이미지이다. 실제 골(Real bone)과 결손만 된 경우(defect only)의 이미지는 대조를 위해 분석하였다.

[37] 도 14의 (A)는 pPTEN을 도입하거나 도입하지 않은 ASC의 세포막 항원에 대한 유세포 분석을 나타낸 것이다. ASC는 CD29, CD44, CD90 및 CD105에 대해서는 양성을 보이고, CD14, CD34, CD45 및 CD31에 대해서는 음성을 보였다. pPTEN을 도입하거나 하지 않은 ASC는 모두 비슷한 형질을 보였다.

[38] (B)는 ASC의 염색체 분석을 나타낸 것이다. 인간 ASC는 배양과정에서 2배체(2n, n=23)의 특성을 유지하였다(왼쪽). pPTEN 도입한 인간 ASC도 어떠한 염색체 이상, 중기 이상, 및 심각한 염색체 전좌를 보이지 않았다(오른쪽).

[39]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[40] 하나의 양태로서, 본 발명은 PTEN 유전자 또는 PTEN을 포함하는, 줄기세포의 조직 재생능 강화용 조성물에 관한 것이다.

[41] 다른 양태로서, 본 발명은 줄기세포에 PTEN 유전자 또는 PTEN을 도입하는 단계를 포함하는, 조직 재생능이 강화된 줄기세포의 제조 방법에 관한 것이다.

[42] 줄기세포를 조직 재생 치료제로 사용하기 위해서는 다량의 줄기세포 확보가 필요하므로 줄기세포를 추출한 후 체외에서 증식시키게 된다. 다만, 증식을 위한 계대수가 증가할수록 줄기세포는 노화되어 조직 재생능이 저하된다. 따라서, 조직 재생능이 우수한 다량의 줄기세포를 확보하는데 어려움이 있었다.

[43] 이에 본 발명에서는 줄기세포의 조직 재생능 강화를 위해, PTEN 유전자 또는 PTEN을 포함하는 줄기세포 강화용 조성물을 제공한다. 또한, PTEN 유전자 또는 PTEN을 도입하여 조직 재생능이 강화된 줄기세포의 제조방법을 제공한다.

[44] 본 발명에서 "PTEN(Phosphatase and Tensin Homologue deleted from chromosome ten) 유전자"는 내인성 지질 포스파타제로서, 세린/트레오닌 포스파타제 및 티로신 포스파타제 활성을 갖는 이중 특이성 단백질 포스파타제를 코딩하는 유전자를 의미한다.

[45] 상기 PTEN 유전자는 당업계에 공지된 PTEN 유전자 또는 그의 절편을 사용할 수 있으며, 또한 PTEN 단백질의 기능을 유지하는 상동성을 가지는 유전자 절편 또는 변이체를 사용할 수 있다.

[46] 상기 PTEN 유전자는 PTEN 서열을 포함하는 벡터의 형태로 제공될 수 있다. 본 발명에서 용어 "벡터"란 상기 벡터가 도입된 세포에서 PTEN 유전자를 발현할 수 있는 발현 벡터를 의미한다. 상기 벡터에는 벡터 내에 도입된 유전자 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함할 수 있다. 상기 벡터의 예로 플라스미드, 코즈미드, 박테리오파아지 및 바이러스 벡터(아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 젝터, 아데노 관련 바이러스 등) 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게, 상기 벡터는 플라스미드일 수 있다.

[47] 또한, 상기 PTEN 유전자는, 당업계에 공지된 세포 내 유전자 전달체, 또는 수송체를 추가로 포함한 형태로 제공될 수 있다. 예를 들어, 리포플렉스(lipoplex), 폴리플렉스(polyplex), CPP(cell permeable peptide) 또는 PTD(protein transduction domain) 등 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[48] 상기 PTD는 PTEN의 세포 내 도입 효율을 증진시킬 수 있는 것이라면 종류에 제한없이 사용될 수 있다. 바람직하게는, 10 내지 16개의 염기성 아미노산으로 이루어진 짧은 펩티드를 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게는 사람의 전사인자인 Hph-1 (GenBank accession no.: NP 004417.2)의 N 말단부터 850번째 아미노산인 티로신부터 860번째 아미노산인 아르기닌으로 이루어진 펩티드 HpH-1-PTD (YARVRRRGPRR; 서열번호: 1)를 사용할 수 있다.

[49] 상기 플라스미드 PTEN과 PTD의 콘쥬게이트는 플라스미드 PTEN과 PTD를 바인딩 버퍼 내에서 물리적으로 결합시켜 제조될 수 있다. 상기 플라스미드 PTEN과 PTD의 결합을 위한 바인딩 버퍼의 조성은 당업자가 적절히 선택할 수 있으며, 본원의 실시예에 기재된 것에 제한되지 아니한다.

[50] 본 발명에서 PTEN은 당업계에 공지된 PTEN 단백질 또는 그의 아미노산 단편을 사용할 수 있으며, PTEN 단백질의 기능을 유지하는 상동성을 가지는

아미노산 서열 또는 변이체를 사용할 수 있다.

[51] 또한, 상기 PTEN은 플라스미드 PTEN과 이를 세포 내로 전달하기 위한 수송체가 결합된 콘쥬게이트가 코딩하는 융합 단백질의 형태일 수 있다. 예를 들어, PTEN 및 CPP 또는 PTD가 결합된 융합 단백질인 형태, 또는 PTEN과 저분자형 프라타민 콘쥬게이트(Low molecular weight protamine)이 결합된 융합 단백질 형태일 수 있다.

[52] 본 발명에서, "줄기세포"는 자가재생능(self-renewal) 및 분화능을 가지는 세포를 의미하며, 인간의 성체 줄기세포, 인간의 만능 줄기세포, 유도 만능 줄기세포(induced pluripotent stem cells), 동물의 배아줄기세포 또는 동물의 성체줄기세포일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게, 상기 줄기세포는 성체 줄기세포 예를 들어, 중간엽 줄기세포, 인간 조직 유래 중간엽 기질세포(mesenchymal stromal cell), 인간 조직 유래 중간엽 줄기세포, 다분화능 줄기세포 또는 양막상피세포일 수 있으며, 중간엽 줄기세포는 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 양막 및 태반으로 구성된 군에서 선택되는 유래의 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, 상기 줄기세포로서 지방 유래 줄기세포를 사용하였다. 지방 유래 줄기세포는 다른 조직의 줄기세포에 비해 양이 풍부하고 추출하기가 쉽다는 점과 치료 적용시 자가지방을 이용하게 됨으로써 면역반응을 줄일 수 있는 장점이 있다.

[53] 본 발명에서 줄기세포는 조직에서 바로 추출된 줄기세포일 수 있으며, 또는 추출된 후 체외에서 계대 배양된 줄기세포일 수 있다. 또한, 미분화 상태의 줄기세포일 수 있으며, 또는 특정 세포로 분화된 상태일 수 있다. 또한, 조직 재생 지지체 상에 분주된 줄기세포일 수 있다.

[54] 본 발명에서, "조직 재생능 강화"란 줄기세포의 조직을 재생시킬 수 있는 능력이 개선되거나, 줄기세포가 추출되어 체외에서 계대 배양된 경우 줄기세포의 조직 재생능이 이전 계대 배양 상태로 회복되거나, 또는 줄기세포가 추출되어 체외에서 계대 배양될 경우 계대수가 증가되어도 조직 재생능이 유지되는 것을 의미한다.

[55] 상기 조직은 간, 뇌, 신경, 연골, 지방, 눈 조직, 청각 조직, 췌장, 심장, 골, 근조직, 담낭 조직, 혈관, 신장, 골수, 폐, 위장, 연조직, 피부조직, 소화 조직, 생식 조직 등과 같은 다양한 조직일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[56] 본 발명의 일 실시예에서는, 체외에서 반복적인 계대 배양에 따라 조직 재생능이 저하된, 후기 계대 지방 유래 줄기세포에 PTEN을 도입하여 백서의 두개골 결손 부위에 이식한 결과, PTEN을 도입하지 않은 후기 계대 지방 유래 줄기세포 및 PTEN을 도입하지 않은 초기 계대 지방 유래 줄기세포 보다 두개골 결손부위에서 골 형성이 현저히 증가하는 것을 확인하였다(실시예 11).

[57] 요컨대, PTEN 유전자 또는 PTEN은 줄기세포의 조직 재생능을 개선시켜주고, 특히, 계대 배양에 따라 이미 노화된 줄기세포의 조직 재생능을 이전 계대 배양상태로 회복시켜 줄 수 있다.

[58]

[59] 또 다른 양태로서, 본 발명은 플라스미드 PTEN 및 PTD의 콘쥬게이트, 및 줄기세포를 포함하는, 조직 재생용 키트에 관한 것이다.

[60] PTEN 유전자 서열을 포함하는 플라스미드에 상기 플라스미드의 세포내 효율을 증진시키기 위한 PTD가 결합된 콘쥬게이트는, 줄기세포에 도입되어 줄기세포의 조직 재생능을 개선시킬 수 있다.

[61] 상기 키트에는 이식부위 내의 효과적인 적용이 가능하도록 하기 위하여 의약학적으로 허용가능한 첨가물을 추가적으로 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 첨가물은 이식되는 전구세포가 이식된 조직내에서 일정한 부피를 유지하면서 일차적 안정성을 향상시키는 스캐폴드(scaffold) 즉, 조직 재생 지지체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[62] 상기 키트에는 줄기세포의 조직 재생능을 방해하지 않는 범위 내에서 조직 재생 효능이 알려진 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 특정 조직으로 분화시키기 위한 조직 특이적인 분화 유도용 배양 배지가 추가로 포함될 수 있다.

[63] 본 발명의 일 실시예에서는 반복적인 계대 배양에 따라 조직 재생능이 저하된 후기 계대 줄기세포에 플라스미드 PTEN 및 PTD의 콘쥬게이트를 도입하고, 이를 조직 재생 지지체에 시딩하였다. 상기 PTEN이 도입된 후기 계대 줄기세포가 시딩된 지지체를 결손된 조직에 이식한 결과, PTEN이 도입되지 않은 후기 계대 줄기세포 및 초기 계대 줄기세포에 비해 조직 재생이 현저히 증가함을 확인하였다.

[64] 요컨대, 플라스미드 PTEN 및 PTD의 콘쥬게이트 및 줄기세포가 포함된 키트는 조직 재생에 유용히 사용될 수 있다.

[65]

[66] 또 다른 양태로서, 본 발명은 줄기세포가 부착된 조직 재생 지지체를 조직 재생이 필요한 부위에 적용시키는 단계를 포함하는 조직 재생방법으로서, 상기 줄기세포는 PTEN 유전자 또는 PTEN이 도입된 것인 조직 재생방법에 관한 것이다.

[67] 상기 줄기세포가 부착된 조직 재생 지지체는, 줄기세포에 PTEN 유전자 또는 PTEN을 도입한 후에 조직 재생 지지체에 부착한 것이거나, 또는 조직 재생 지지체에 줄기세포를 부착한 후 PTEN 유전자 또는 PTEN을 도입한 것일 수 있다.

[68] 상기 조직 재생이 필요한 부위는 조직의 결손이 있는 부분 또는 조직의 기능이 저하된 부위일 수 있다.

[69] 상기 줄기세포는 인간의 성체 줄기세포, 인간의 만능 줄기세포, 유도 만능 줄기세포, 또는 동물의 배아 줄기세포 또는 성체줄기세포일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는 성체 줄기세포이며, 예를 들어, 중간엽 줄기세포, 인간 조직 유래 중간엽 기질세포(mesenchymal stromal cell), 인간 조직

유래 중간엽 줄기세포, 다분화능 줄기세포 또는 양막상피세포일 수 있으며, 중간엽 줄기세포는 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 양막 및 태반으로 구성된 군에서 선택되는 유래의 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)일 수 있다. 보다 바람직하게는 지방 유래 줄기세포일 수 있다.

[70]

[71] 또 다른 양태로서, 본 발명은 PTEN 유전자 또는 PTEN을, 체외에서(in vitro) 계대 배양된 줄기세포에 도입하는 단계를 포함하는, 줄기세포를 이전 계대 배양 상태로 회복시키는 방법에 관한 것이다.

[72] 또한, 본 발명은 PTEN 유전자 또는 PTEN을 포함하는, 줄기세포의 회춘 조성물(rejuvenating composition)로서, 체외에서(in vitro) 줄기세포의 계대 배양 횟수 증가에 따라 나타나는 줄기세포 내 노화 관련 β-갈락토시다아제 발현 증가, 줄기세포의 크기 증가, 줄기세포의 증식률 감소, 증식기간 감소, 텔로머라아제 활성 감소, 또는 줄기세포의 분화능 감소로 나타나는 노화진행을 역방향으로 진행시키는 것인 조성물에 관한 것이다.

[73] 본 발명에서 "줄기세포의 노화"란, 계대 배양 횟수 증가에 따라 줄기세포에서 노화 관련 β-갈락토시다아제 발현이 증가되거나, 줄기세포의 크기가 증가되거나, 줄기세포의 증식률이 감소되거나, 증식기간이 감소되거나, 텔로머라아제 활성 감소, 또는 줄기세포의 분화능이 감소되는 현상을 의미한다.

[74] 상기 분화능 감소는 줄기세포의 특정 조직 세포로의 분화하는 능력이 감소되는 것을 의미하는 것으로서, 상기 특정 조직 세포는 예를 들어, 심장, 신경, 간, 피부, 연골, 지방, 골 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[75] 줄기세포를 체외에서 계대 배양하게 되면, 후기 계대로 갈수록 줄기세포는 노화 관련 β-갈락토시다아제 발현 증가하고, 줄기세포의 표면적이 크고 팔길이기 길어지며, 줄기세포의 증식률이 감소되고, 텔로머라아제 활성이 감소되고, 최대 증식할 수 있는 기간이 감소되고, 줄기세포의 분화능이 감소하는 노화진행 현상이 나타난다.

[76] 본 발명은 상기와 같은 현상이 나타난 이미 노화된 줄기세포에 PTEN 유전자 또는 PTEN을 도입함으로써, 상기 노화 현상을 이전 계대 배양상태(초기의 계대 배양상태)로 회복시킬 수 있으며, 또는 상기 노화 진행을 역방향으로 진행시켜, 줄기세포의 상태를 회춘(rejuvenating)시킬 수 있다.

[77] 본 발명의 일 실시예에서는, 체외에서 반복적으로 계대 배양하여 분화능이 저하된 후기 계대의 지방 유래 줄기세포에 PTEN을 도입한 결과, 골 또는 지방으로의 분화능이 초기 계대의 지방 유래 줄기세포와 유사한 상태로 회복 또는 회춘되는 것을 확인하였다(실시예 8).

[78] 본 발명에서 유전자를 줄기세포에 도입하는 방법은 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다. 예를 들어, 인산칼슘 또는 염화칼슘 공침전법, 전기천공법, DEAE-덱스트란 매개법, 리포펙타민을 이용한 지질 매개법, PTD 또는 CPP 사용 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[79]

[80] 또 다른 양태로서, 본 발명은 PTEN 유전자 또는 PTEN을 줄기세포에 도입하는 단계를 포함하는, 줄기세포의 노화 지연방법으로서, 상기 노화는 체외에서(in vitro) 줄기세포의 계대 배양 횟수 증가에 따라 나타나는 줄기세포 내 노화 관련 β-갈락토시다아제 발현 증가, 줄기세포의 크기 증가, 줄기세포의 증식률 감소, 증식기간 감소, 텔로머라아제 활성 감소, 또는 분화능 감소인 것인 방법에 관한 것이다.

[81] 상기 분화능 감소는 줄기세포의 특정 조직 세포로의 분화하는 능력이 감소되는 것을 의미하는 것으로서, 상기 특정 조직 세포는 예를 들어, 심장, 신경, 간, 피부, 연골, 지방, 골 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[82] 또한, 본 발명은 PTEN 유전자 또는 PTEN을 포함하는, 줄기세포의 노화 지연용 조성물로서, 상기 노화는 체외에서(in vitro) 줄기세포의 계대 배양 횟수 증가에 따라 나타나는 줄기세포 내 노화 관련 β-갈락토시다아제 발현 증가, 줄기세포의 크기 증가, 줄기세포의 증식률 감소, 증식기간 감소, 텔로머라아제 활성 감소,또는 분화능 감소인 조성물에 관한 것이다.

[83] 본 발명에서는 PTEN 유전자 또는 PTEN을 줄기세포에 도입하여, 계대 배양 횟수 증가에 따라 나타나는 노화 현상을 지연시킬 수 있다.

[84] 본 발명의 일 실시예에서는, PTEN을 도입한 지방 유래 줄기세포와 PTEN을 도입하지 않은 지방 유래 줄기세포를 계대 배양한 결과, 계대 횟수가 증가할수록 PTEN을 도입한 지방 유래 줄기세포가 PTEN을 도입하지 않은 지방 유래 줄기세포에 비해 줄기세포 내 노화 관련 β-갈락토시다아제 발현 증가, 줄기세포의 크기 증가, 줄기세포의 증식률 증가, 증식기간 감소, 텔로머라아제 활성 감소, 또는 분화능 감소의 폭이 현저히 감소되는 것을 확인하였다.

[85]

[86] 또 다른 양태로서, 본 발명은 PTEN 유전자, 및 PTD(protein transduction) 또는 CPP(cell permeable peptide)의 콘쥬게이트를 제공한다.

[87] 또한, 본 발명은 PTEN, 및 PTD, CPP, 또는 저분자형 프로타민의 콘쥬게이트를 제공한다.

[88]

발명의 실시를 위한 형태

[89] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되는 것은 아니다.

[90]

[91] **실시예 1: 인간 지방 조직에서 줄기세포의 분리 및 배양**

[92] 지방 조직 유래의 중간엽 줄기세포(Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells,ASCs)는 갓 잘라낸 인간 피하지방조직에서 분리해내었다. 지방조직을 2-3

mm^3정도로 잘게 갈은 뒤 둘베스코스 인산 완충 식염수(Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS)로 세척했다. 그 지방조직을 0.05% 콜라게나제 타입 I(collagenase type I) 및 1% BSA를 포함하는 콜라게나제 완충용액(collagenase buffer)(100mM HEPES, 120 mM NaCl, 50 mM KCl, 1mM $CaCl_2$, 50mM 글루코즈, pH 7.4)에 넣어 37℃에서 30분간 흔들어주었다. 조직 현탁액을 250μm 필터에 거르고, 500 x g의 중력으로 실온에서 20분간 원심분리하였다. 상층액을 버리고, 펠렛(pellet)을 10% 우태아 혈청(FBS)이 추가된 둘베스코스 최소 필수 배지(Dulbecco's minimum essential medium, DMEM)에서 재부유시켰다. 세포는 포화되지 않도록 배양하여, 세척 후 트립신 처리하고, 계대 배양하였다.

[93]

[94] **실시예 2: 플라스미드 PTEN 및 CPP(cell permeable peptide) 콘쥬게이트의 제조**

[95] 인간 PTEN을 암호화하는 플라스미드를 제작하기 위해, *EcoRI*과 *XhoI* 제한효소 절단부위를 이용해 전장(full length) 인간 PTEN 서열을 pCMV-Tag 2B (Stratagene, La Jolla, CA, USA) 벡터 내에 클로닝하였다. pG5CAT 벡터 (Invitrogen Coporation, Carlsbad, CA, USA)로부터 5개의 공통 GAL4 결합 부위($UAS_{17merx5}$)를 증폭하고, 증폭된 PCR 산물을 pCMV-PTEN 벡터 내에 결찰시켰다. 해당 플라스미드는 Endofree Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 정제하였다.

[96] pCPP-Gal4-DBD가 주입된 *E. coli*BL21 star(DE3) pLysS 세포(Invitrogen, USA)를 100μg/mL 앰피실린(ampicillin)과 34μg/mL 클로람페니콜(chloramphenicol)을 넣은 LB배지에서 37℃에서 OD_{600} 0.6이 될 때까지 키웠다. 이에 1mM 이소프로필-β-D-티오갈락토피라노시드(isopropyl-ß-D-thiogalactopyranoside, IPTG)를 넣어 37℃에서 4시간 동안 배양하여 단백질 발현을 유도시켰다. 원심분리로 세포를 수득하고 용해 완충액(lysis buffer)(10mM 이미다졸(imidazole), 50mM 인산 나트륨(sodium phosphate), 300mM NaCl, pH 8.0)에 재부유시켜, 초음파로 세포를 용해하였다. 세포 용해물을 원심분리(13,000rpm, 20분, 4℃)한 후 Ni-NTA 수지(Qiagen, Hilden, Germany) 50% 현탁액과 4℃에서 1시간 동안 부드럽게 섞었다. 부착되지 못한 단백질은 20 mM 이미다졸 완충액(imidazole buffer)으로 컬럼(column)을 세척하여 제거하고, 부착된 단백질은 250 mM 이미다졸 완충액으로 용출하였다. 용출된 단백질을 농축시키고, 10% 글리세롤 및 PBS에 대해 투석하여, 사용하기 전까지 80℃에서 보관하였다. pEGFP 3μg과 Hph-1-CPP 125μg을 결합 완충액(binding buffer)(10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM 디티오트레이톨(dithiothreitol), 3 mM $MgCl_2$, 0.1% 트리톤 X-100, 5% 글리세롤, 25 μg/ml 우혈청 알부민(bovine serum albumin))에 넣어 실온에서 30분간 결합시켰다.

[97]

[98] **실시예 3: pPTEN을 도입한 지방 유래 줄기세포의 PTEN 발현 분석**

[99] In vitro에서 지방 유래 줄기세포(ASC)에 pPTEN-CPP 플라스미드를 도입시키고 4시간동안 배양하였다. pPTEN을 도입한 ASC의 in vitro상 pPTEN의 발현을 면역 형광 염색을 통하여 확인하였다. 면역 형광 염색에는 토끼 항-PTEN 1차 항체를 사용하였다. 구체적으로, 세포는 3.7% 포름알데히드(formaldehyde)가 포함된 PBS로 고정하고, 0.2% Triton-X-100가 들어있는 PBS로 10분간 처리해 준 뒤, 염소 혈청으로 실온에서 블로킹하였다. 샘플은 항-인간 PTEN 항체로 1시간 동안 인큐베이션한 뒤, 로다민-결합된 항-토끼 IgG 항체로 1시간 동안 인큐베이션하였다. 상기 샘플을 PBS로 세척한 뒤, 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI; Santa Cruz, CA, USA) 용액으로 핵을 염색하였다. 이를 BZ-8000 형광현미경(Zeiss, Germany)으로 관찰하였다.

[100] 그 결과, pPTEN-CPP 도입된 ASC에서 pPTEN의 발현을 볼 수 있었다. pPTEN-CPP이 도입되지 않은 세포에서는 PTEN이 발현되지 않은 반면에, pPTEN-CPP이 도입된 세포에서는 세포의 핵부분에서 pPTEN이 강하게 발현되는 것을 확인하였다(도 1). 이는 ASC 내로 플라스미드 PTEN이 효율적으로 도입되었으며, 세포 내에서 유전자가 발현되어 단백질을 생산하였음을 시사한다.

[101]

[102] **실시예 4: 노화 관련 β-갈락토시다아제(SA-β-gal) 발현 저해**

[103] β-갈락토시다아제 염색 키트(Cell Signaling Technology, Beverly, MA)를 이용하여, PTEN이 줄기세포의 노화 관련 β-갈락토시다아제(senescence-associated β-galactosidase, SA-β-gal) 발현에 미치는 영향을 확인해보았다. 구체적으로, PTEN을 도입한 ASC와 도입하지 않은 ASC를 7 내지 11 계대까지 배양하였다. 상기 세포들을 6 웰 플레이트(well plate)에 5 x 10^4/웰의 밀도로 분주시키고, 하룻밤 동안 부착시켰다. 그런 후 PBS로 세척하고, 고정하여 제조사의 프로토콜에 따라 pH 6.0의 X-gal 발색 기질(chromogenic substrate)을 37℃에서 하룻밤 동안 인큐베이션시켰다. 100배 확대하여 색깔 변화를 확인하였다.

[104] 그 결과, ASC는 계대 배양 횟수가 증가할수록 β-갈락토시다아제의 염색되는 세포의 수가 증가하였다. 또한, 7 내지 9 계대수 까지는 PTEN의 도입 유무에 따라 β-갈락토시다아제가 염색되는 세포수가 비슷하였으나, 10 계대수 부터는 PTEN을 도입한 ASC는 도입하지 않은 경우와 비교해서, β-갈락토시다아제가 발현되는 세포수가 두드러지게 적었다(도 2).

[105]

[106] **실시예 5: 지방 유래 줄기세포의 크기 증가폭 감소**

[107] 계대 배양에 따라, PTEN을 도입한 지방 유래 줄기세포와 PTEN을 도입하지 않은 지방 유래 줄기세포의 크기 변화를 측정하였다.

[108] 구체적으로, PTEN을 도입한 ASC와 도입하지 않은 ASC를 7 내지 11 계대까지

배양하면서, 줄기세포의 크기 변화를 관찰하였다.

[109] 초기 계대 배양 상태의 ASC는 작은 팔을 가지고 있고, 크기가 작았으나, 계대 배양 횟수가 증가할 수록 크기는 커지면서 납작해지고, 팔이 뻗어나가는 것이 관찰되었다. 그러나, PTEN 유전자가 도입된 ASC는 PTEN을 도입하지 않은 ASC에 비해 계대 배양 횟수 증가에 따른 세포 크기 증가의 폭이 감소되고, 보다 더 짧은 팔을 가지고 있는 것이 관찰되었다(도 3 및 도 4).

[110]

[111] **실시예 6: 텔로머라아제(telomerase) 활성 측정**

[112] 텔로머라아제 활성은 세포 노화 레벨을 결정하는데 하나의 기준이 될 수 있으므로, 텔로머라아제 탐지 키트(Telomerase Detection Kit (TRAPeze RT Telomerase Detection Kit, CHEMICON, USA & Canada))를 사용하여 줄기세포의 텔로머라아제(telomerase) 활성을 확인하였다. 텔로머라아제는 열에 민감하므로, 각 측정은 열-처리된 샘플의 결과로 교정되었다.

[113] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, P7에서 PTEN을 도입한 ASC 집단과 PTEN을 도입하지 않은 ASC 집단의 상대적인 텔로머라아제 활성은 유사하였으나, 계대 배양 횟수가 증가함에 따라 양 집단은 차이가 심해졌다. PTEN을 도입한 ASC 집단에서 텔로머라아제 활성이 현저히 증가됨이 관찰되었다.

[114]

[115] **실시예 7: 지방 유래 줄기세포의 증식률 및 증식기간에 미치는 영향 확인**

[116] PTEN을 도입하지 않은 대조군 ASC 및 PTEN을 도입한 ASC를 동일한 환경에서 배양하였다. 세포를 T75 플라스크에서 배양하고, 4일 또는 5일 마다 분리시켰다. 세포들을 분리시킨 후, haemacytometer를 사용하여 각각의 T75 플라스크 내의 ASC 집단 개체수를 계산하였다.

[117] 세포집단 배가 시간(population doubling)을 다음의 식을 이용하여 계산하였다 :

[118] 수학식 1

$$\text{집단배가시간} = \log\left[\frac{\text{특정시각에서전체세포수}}{\text{최초세포수}}\right] / \log 2$$

[119] 두 집단의 증식율은 8PDs까지는 비슷하였으나 그 이후로는 PTEN을 도입한 집단이 대조군 집단에 비하여 두 배로 증식하였다. 이는 40일까지 유지되었다. 또한, PTEN이 도입된 집단의 ASC는 16회까지 계대 배양된 반면, PTEN이 도입되지 않은 대조군의 ASC는 15회까지 계대 배양되고 증식이 멈췄다(도 6).

[120]

[121] **실시예 8: 지방세포 및 골세포로의 분화능 회복에 PTEN이 미치는 영향**

[122]

[123] **8-1. 지방세포로의 분화능 회복에 미치는 영향**

[124]

[125] 먼저, PTEN이 ASC의 지방세포로의 분화능에 미치는 영향을 확인하기 위해,

ASC를 표준 지방세포 유도 배지에 3주간 배양한 후 Oil Red-O 염색을 행하였다.

[126] 구체적으로, 지방세포로의 분화를 위해 6계대 및 12계대의 ASC를 $1x10^4$ cells/웰의 밀도로 6 웰 플레이트에 각각 분주하였다. 또 다른 12계대의 ASC를 다른 6 웰 플레이트에 분주하고, 플라스미드 PTEN-PTD 콘쥬게이트를 배양액에 넣어 48시간 동안 두었다. 모든 세포를 일반 배양액에 24시간 유지시킨 후, 10% FBS, 0.5mM 이소부틸메틸잔틴(isobutylmethylxanthine), 10μM 인슐린, 0.5μM 덱사메타손(dexamethasone), 및 50μM 인도메타신(indomethacin)을 포함하는 둘베코스 변형된 이글 배지(Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM))에서 3일에 한번씩 배양액을 갈아주며 3주간 지방세포로의 분화를 유도시켰다. 3가지 그룹의 웰을 오일 레드-O(Oil Red-O)로 염색시켰다. 3주간의 분화 유도 후에 웰들은 PBS로 헹군 후 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 10분간 고정시켰다. 이를 60% 이소프로판올(isopropanol)로 세척한 뒤, 실온에서 2%(w/v) 오일 레드-O 용액으로 5분간 인큐베이션하였다. 이후 이소프로판올로 다시 한번 세척한 뒤, 증류수로 반복하여 세척하였다. 정량분석을 위해, 각 배양 웰에서 오일 레드-O로 염색된 전체 양은 100% 이소프로판올 200㎕로 용출하여 결정되었으며, 상기 용액의 분광 흡광도는 Versamax 마이크로플레이트 리더기(microplate reader (Molecular Devices))를 이용하여 500nm에서 분석되었다. 오일 레드-O 염색 용액의 총량은 흡광도와 1차 함수적으로 비례하였다.

[127] 세포내 염색된 지질입자의 크기를 비교한 결과, 6계대(P6)와 12계대(P12) 간에 상당한 차이를 보였다. P6의 ASC에 비해 P12의 ASC에서 오일 레드-O에 의해 염색된 세포의 수와 축적된 지방의 양이 크게 감소되어 있었다. 평균적으로, P6 세포(4.39±0.12)에 비해 P12 세포(2.30±0.22)에서 지방이 절반 정도밖에 축적되지 않았다. 이는 계대횟수가 증가할 수록 지방세포로의 분화능이 감소된다는 것을 보여주는 것이었다. 반면, pPTEN을 도입한 12계대의 ASC는 도입하지 않은 때에 비해 더 넓은 지방세포 면적을 보였다. pPTEN을 도입한 12계대의 ASC(3.82±0.37)에 축적된 지방의 총량 또한 도입되지 않은 세포(2.30±0.22)에 비해 월등히 높았으며, P6과 유사한 지방세포 면적을 보여 pPTEN을 도입한 P12 ASC이 P6 ASC의 분화능 상태로 회복되었음을 알 수 있다(도 7a).

[128] 상기 결과는, PTEN이 계대 배양 횟수 증가에 따라 감소하는 지방 유래 줄기세포의 분화능을 이전 계대 배양의 분화능 상태로 회복시켜줄 수 있음을 시사한다.

[129]

[130] **8-2. 골세포로의 분화능 회복에 미치는 영향**

[131]

[132] 골세포로의 분화를 위해 6계대 및 12계대의 ASC를 $1x10^5$ cells/웰의 밀도로 6 웰 플레이트에 각각 분주하였다. 또 다른 12계대의 ASC를 다른 6 웰 플레이트에 분주하고, 플라스미드 PTEN-PTD 콘쥬게이트를 배양액에 넣어 48시간 동안 두었다. 모든 세포를 일반 배양액에 24시간 유지시킨 후, 10% FBS, 0.1μM

덱사메타손, 50μM 아스코르베이트-2-포스페이트(ascorbate-2-phosphate), 및 10mM β-글루세로포스페이트(β-glucerophosphate)를 포함하는 DMEM에서 3일에 한번씩 배양액을 갈아주며, 3주간 골세포로의 분화를 유도시켰다. 칼세인(Calcein) 염색을 위해, 세포를 5㎍/ml의 칼세인을 포함하는 배양액으로 37℃, 5% CO_2조건에서 밤새 처리하였다. 그 후 PBS로 두번 세척한 후 현미경으로 관찰하였다. 정량분석을 위해, 알카라인 포스파테이즈(alkaline phosphatase, ALPase) 활성도를 측정하였다. 세포를 용해시켜 쿠마시 블루 제제(Coomassie Blue Reagent (Pierce))를 이용하여 단백질 농도를 측정하였다. 동량의 단백질을 기준으로 ALPase 활성을 측정하였다. 이는 *p*-니트로페놀 포스페이트(*p*-nitrophenol phosphate)를 *p*-니트로페놀(*p*-nitrophenol)로 전환시키는 정도를 이용하는 상업적으로 제품화된 키트(Sigma Chemicals, St. Louis, MO)를 통하여 측정할 수 있었다. 표준 곡선은 파라-니트로페놀(para-nitrophenol)로 만들어지고, 표준 샘플과 실험 샘플은 모두 420 nm의 파장에서 분광분석하였다.

[133] 그 결과, 도 5b에서 볼 수 있듯이 P6의 ASC에서는 넓은 농도범위에 걸쳐 칼세인으로 형광 염색된 것을 확인할 수 있다. 같은 인큐베이션 시간 동안 P6 ASC가 P12에 비해 많은 칼세인을 생산하였다. 이는 계대가 지날수록 골세포로의 분화능이 감소된다는 것을 보여주는 것이었다. 반면, pPTEN을 도입한 12계대의 ASC는 도입하지 않은 때에 비해 더 넓은 골세포 면적을 보였다. 정량 분석을 위해, ALPase 활성 실험을 측정한 결과, P6에서 ALPase의 활성은 P12의 2.5배에 달하였다. 그러나, pPTEN을 도입한 P12 ASC에서의 ALPase의 활성(2.15±0.14)은 도입되지 않은 P12에 비하여 증가되며, P6과 유사한 ALPase의 활성을 보여 pPTEN을 도입한 P12 ASC이 P6 ASC의 분화능 상태로 회복되었음을 알 수 있다(도 7b).

[134] 상기 결과는, PTEN이 계대 배양 횟수 증가에 따라 감소하는 ASC의 분화능을 이전 계대 배양의 분화능 상태로 회복시켜줄 수 있음을 시사한다.

[135]

[136] **실시예 9: 지방 유래 줄기세포의 연골로의 분화능 유지**

[137] 2% 우태아 혈청, 1% (w/v) 항생제(antibiotics/antimycotics), 1X ITS, 37.5㎍/ml 아스코르베이트-2-포스페이트, 100nM 덱사메타손, 10ng/ml TGF β3, 10ng/ml BMP-6가 첨가된 둘베코스 변형된 이글 배지-고 글루코즈가 포함된 연골 분화용 배지를 준비하였다.

[138] PTEN이 도입된 7계대 ASC(P7) 및 12계대 ASC(P12), 및 PTEN이 도입되지 않은 7계대 ASC(P7) 및 12계대 ASC(P12)를 연골 분화용 배지에 배양하여 연골로의 분화를 유도하였다. PTEN이 도입되지 않은 대조군 및 PTEN을 도입한 ASC의 연골세포로의 분화여부를 콜라겐 타입 II, 어그레칸(aggrecan) 및 COMP에 대한 역전사 PCR을 통해 확인하였다. GAPDH는 항존 유전자로써 분석하였다.

[139] 총 RNA(total RNA)는 제조사의 지시에 따라 트리졸 제제(Trizol reagent) 를 이용하여 추출하였다. 역전사 PCR은 TOPscript™ One-step RT PCR kit

(Enzynomics, Korea)를 이용하였다. 각 콜라겐 타입 II, 어그레칸, COMP 및 GAPDH의 프라이머 염기서열은 기존에 게재된 mRNA 서열을 이용하여 설계하였다. 프라이머 염기서열과 온도 조건은 이하 표 1에서 보는 바와 같았다(서열번호 2 내지 9). 역전사 PCR 반응은 MJ Mini personal Thermal Cycler (Biorad, USA)에서 이루어졌다.

[140] 표 1

[Table 1]

유전자	서열(5'→3')		온도	사이클
COL II	(S) (AS)	GCACCCATGGACATTGGAGGG GACACGGAGTAGCACCATCG	50℃ 0:30 94℃ 5:00 94℃ 0:30 58℃ 1:00 72℃ 0:30 72℃ 5:00	40
어그리칸	(S) (AS)	CCTTGGAGGTCGTGGTGAAAGG AGGTGAACTTCTCTGGCGACGT	50℃ 0:30 94℃ 5:00 94℃ 0:30 61℃ 1:00 72℃ 0:30 72℃ 5:00	38
COMP	(S) (AS)	CAGGACGACTTTGATGCAGA AAGCTGGAGCTGTCCTGGTA	50℃ 0:30 94℃ 5:00 94℃ 0:30 61℃ 1:00 72℃ 0:30 72℃ 5:00	35
GAPDH	(S) (AS)	CTTTTAACTCTGGTAAAGTGG TTTTGGCTCCCCCCTGCAAAT	50℃ 0:30 94℃ 5:00 94℃ 0:30 57℃ 1:00 72℃ 0:30 72℃ 5:00	40

[141]

[142] 역전사 PCR 결과물은 2% 아가로즈 젤에 전기영동하여 EtBr로 염색 후 ChemiImager™ (Alpha Innotech corporation)를 통하여 시각적으로 확인하였다.

[143] PTEN이 도입된 P7에서 콜라겐 타입 II의 발현이 대조군 P7에 비해 두드러지게 증가하였다. 그러나 P12에서는 PTEN이 도입되거나 도입되지 않거나 관계없이 콜라겐 type II가 발현되지 않았다. 어그레칸은 모든 그룹에서 발현되었으며, 특히 PTEN이 도입된 P7, 대조군 P7 및 PTEN이 도입된 P12에서 강하게 발현되었으나, 대조군 P12에서는 약한 발현을 보였다. COMP의 발현은 4 그룹에서 모두 비슷하였다(도 8 및 도 9).

[144] 상기 결과는 ASC는 계대 배양 횟수 증가에 따라 연골로의 분화능이 감소되는데, PTEN이 도입된 ASC를 계대 배양하면, 반복적인 계대 배양 과정에서 연골로의 분화능 유지에 긍정적인 영향을 미침을 시사한다.

[145]

[146] **실시예 10: PTEN이 줄기세포 사멸(apoptosis)에 미치는 영향**

[147] PTEN이 줄기세포 사멸에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자, PTEN의 도입 유무에 따른 세포사멸 관련 단백질을 분석하였다. 세포사멸 관련 단백질 분석에는 Human apoptosis array kit (R&D systems, MN, USA)를 이용하였다. 대조군 또는 PTEN 유도된 ASC를 매 계대(6p에서 11p)마다 분리하여 세포 용해 용액으로 용해시켰다. 총 단백질 분석은 Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, IL, USA)을 사용하여 수행하였으며, 총 단백질 200㎍으로 세포사멸 분석을 하였다. 모든 과정은 제조사의 지시에 따라 이루어졌다.

[148] 모든 과정 후에, 웨스턴 블롯팅 루미놀 제제(Western Blotting Luminol Reagent) A 용액과 B 용액(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)을 1 : 1로 섞어 각 열에 첨가하였다. 각 스팟들의 발광정도(density)는 LAS-3000 luminescent image analyzer (Fujifilm, Japan)로 측정하였다.

[149] 다양한 세포사멸 관련 단백질 중에서 프로-카스파제 3(Pro-caspase 3), 절단된 카스파제 3(cleaved caspase 3), 시토크롬 c(cytochrome c) 및 Fas/TNFRSF6의 발현 정도를 분석하였다. 발현정도를 양자화하기 위해 Multigauge (Fujifilm, Japan)를 이용하였다.

[150] 그 결과, 6계대에서 11계대에 이르는 동안, 세포사멸 관련 단백질의 발현에는 특별한 차이를 보이지 않았다(도 10 및 11).

[151]

[152] **실시예 11: PTEN이 in vivo 지지체 상에서 줄기세포의 골 형성에 미치는 영향**

[153]

[154] **11-1. 지방유래 줄기세포가 생착된 지지체 제작**

[155]

[156] 본 발명에서 생체 모방 3차원 지지체는, 분리된 지방 유래 줄기세포가 3차원적으로 부착하고 이동할 수 있는 능력이 있는지를 평가하기 위한 기층으로 사용하였다.

[157] 지지체 제작에는 전기방사기술을 이용하였다. 구체적으로, 폴리(L-락트산)(PLLA)을 혼합 유기용매(메틸렌 클로라이드/아세톤(9:1, v/v))에 녹여 폴리머 용액을 만들었다. 20%의 폴리머 용액을 지름 0.84 mm의 10-ml 주사기에 담았다. 전기 방사는 10kV의 전압(Chungpa EMT, Korea)이 걸린 멸균 환경에서 0.06 ml/min의 유량으로 행해졌다. 분사 팁과 접지전극간의 거리는 20cm였다. 섬유성 매트는 알루미늄 호일 시트 위에 집속(collect)되었으며, 세포의 부착과 살포(spreading)가 수행되었다. PLLA를 전기방사한 섬유성 매트를 5-mm 지름의 원으로 잘라내어 24-웰 배양접시(Nunc, Denmark)에 놓았다. 6계대 및 12계대의

ASC를 지지체 위에 시딩한 후 7일동안 배양했다. 그 후 세포를 2.5 % 글루타르알데히드(glutaraldehyde)에 10분간 고정하고 고정액을 흡입제거하였다. PBS로 세척한 뒤 전기방사된 섬유지지체를 농도를 높여가는 에탄올 용액으로 탈수시켰다. 샘플을 sputter coater (POLARON SC7620, UG Microtech, England)를 이용해 금으로 코팅한 후, 이를 scanning electron microscopy(SEM)(JEOL, model JSM 5200, JEOL, Tokyo, Japan)을 통해 관찰했다. 또한, 지지체는 10% 포르말린이 포함된 PBS로 15분간 고정하고 PBS로 두 번 세척했다. 섬유지지체에 부착된 세포를 헤마톡시린(hematoxylin)과 에오신(eosin)으로 염색했다.

[158] SEM에 의해 보여지는 대로 전기방사된 섬유들이 섬유상 매트를 형성하였으며, 지방 유래 줄기세포는 시딩된 후 섬유상 매트 위에 포화된 단일 세포층을 형성하였다. 헤마톡시린 및 에오신 (H&E) 염색을 통해 ASC가 증식하고 있다는 것과 지지체로 세포이동해 왔다는 것을 확인하였다(도 12a). ASC를 지지체 위에서 7일간 배양한 후 부착된 형상을 SEM으로 확인했다. 부착된 ASC는 대부분 원형질이 확장된 모습을 보였다. 지방 유래 줄기세포를 7일동안 배양한 섬유지지체를 H&E 염색한 결과도 SEM을 통한 관찰결과와 일치하여, 줄기세포가 지지체에 풍부하게 부착된 것과 이의 증식으로 인해 지지체의 큰 공극이 결합조직으로 완벽하게 채워져 있는 것을 확인할 수 있었다(도 12의 A-c).

[159]

[160] **11-2. 두개골 결손 백서의 골형성 증가 효과**

[161]

[162] 백서(9주 SD-백서 수컷)를 다음과 같이 4개의 군으로 나누어 이하 실험에 이용하였다. 동물들은 케타민(ketamine)(30 mg/체중 kg)을 복강내 주사하여 마취시켰다. 수술부위를 0.5 % 클로르헥시딘(chlorhexidine)으로 닦아낸 후, 머리 주위를 따라 선상 절개를 하였다. 연부조직을 들어내고 그 부위에서 골막을 잘라내었다. 개두술(craniotomy) 결손(5-mm 지름)은 생리 식염수와 함께 치과용 드릴의 절삭용 버(trephine burr)를 통해 생성시켰다. 두개골을 절삭한 뒤, (1) 지지체, (2) P6 지방 유래 줄기세포, (3) P12 지방 유래 줄기세포, 또는 (4) pPTEN을 도입한 P12 지방 유래 줄기세포를 시딩한 지지체를 해당 결손부위에 이식시켰다. 그 후 연부조직과 피부를 덮어 봉합하였다. 이식 후 12주차에 동물들을 희생시켜, 회수한 시료를 포르말린 용액에 고정하고 5% 트리클로아세틱(trichloroacetic) 산 용액으로 탈회시켜 파라핀에 박았다. 관상면으로 자른 후(5-μm 두께) 광학현미경으로 관찰할 수 있도록 골드너-맨손스 트리크롬(Goldner-Masson's trichrome)과 오스테오칼신(osteocalcin)으로 염색하였다. Olympus BH-2 광학현미경(Olympus Optical, Osaka, Japan)을 통해 현미경 관찰하였다.

[163] 도 12(b)에서는 백서의 두개골 결손에 지지체를 삽입했을 때 조직 표본을 보여주고 있다. 수술후 4주가 지난 경우, ASC를 유입하지 않은 결손부위에는

결합조직이 헐겁게 형성되어 있다. 결손부위의 관상톱에 의한 여백은 매우 얇은 층판 뼈로 덮여 있고, 결손부위는 아무런 골형성의 징후없이 섬유성 결합조직으로 채워져 있을 뿐이었다. 반면, 결손부위에 ASC가 시딩된 지지체를 삽입한 경우에는 골세포가 형성되는 것이 관찰되었다.

[164] 6계대의 ASC를 시딩한 지지체를 삽입한 집단에서는 12계대를 접종한 지지체를 사용한 집단에 비해 결손부위의 경계와 중앙 부분에서 더 많은 골세포가 형성되는 현상을 보였다. 또한, 더 많은 결손부위가 결손부위 여백에서 자란 새로운 골세포에 의해 채워지는 것을 확인하였다. 반면, PTEN이 도입된 12계대의 ASC를 시딩한 지지체를 이식시킨 집단에서는 PTEN을 도입하지 않은 12계대의 ASC 및 6계대의 ASC를 시딩한 지지체를 이식시킨 집단보다 결손부위의 경계와 중앙 부분에서 더 많은 골세포가 형성되는 형상을 보였다.

[165]

[166] **11-3. 골형성의 micro-CT 분석**

[167]

[168] Micro-CT scanner(μ-CT20, Scanco Medical, Bassersdorf, Switzerland)를 이용하여 결손부위에 골형성 정도를 측정하였다. 박아 놓은 시료를 두개골의 관상면이 수평으로 위치하도록 15.4 mm 지름의 원통형 샘플 홀더에 위치시켰다. 두개골의 관상면에 평행한 방향으로 시료가 스캐닝되었다. 단면에 해당하는 픽셀 크기와 25 ㎛의 두께 슬라이스로 고 해상도의 스캐닝을 수행하였다. 단면의 갯수는 두개골 전체 두께를 포함할 수 있는 100개로 설정하였다. micro-CT 스캐너에 내재되어 있던 소프트웨어로 전체 스캔 결과를 3D 이미지로 복원하였다. 삽입물의 부피(VOI)는 반자동 윤곽대비를 이용하여 선택하였다. 주문제작한 컴퓨터 프로그램을 이용하여 자동으로 측정된, 골 부피 분획(bone volume fraction) (BV/TV), 소주 두께(trabecular thickness) (Tb.Th), 소주 수(trabecular number) (Tb.N), 및 소주 분리(trabecular separation) (Tb.Sp)등 구조적 인수들을 얻었다 .

[169] 상기 값을 수술 후 12주가 지난 뒤 확인한 결과, 12계대 ASC를 시딩한 경우(3.50±0.09)에 비해 6계대 ASC를 시딩한 지지체를 이식했을 때(6.08±2.03) 결손부위에 형성된 뼈의 부피가 두 배에 달했다. 두 집단은 BV/TV 및 Tb.Th.를 포함하는 구조적 인수들에서도 통계적으로 상당한 차이를 보였다. P6 집단에 비해 P12 집단의 형성된 뼈의 부피가 두드러지게 감소했다. 반면, pPTEN 도입 P12 집단에서의 뼈의 부피(20.80±4.06)는, PTEN을 도입하지 않은 P12 집단 및 P6 집단에 비해 현저히 증가하는 모습을 보였는데, PTEN을 도입하지 않은 줄기세포에 비해 골형성이 약 7.4배 증가하였다. 즉, pPTEN을 도입한 후 P12 집단의 골 형성이 증가하였고 Tb.Th 또한 증가하였다(도 13, 표 2).

[170] 표 2

[Table 2]

		Real bone	Only defect	Only scaffold	P6	P12	P12-pPTEN
Percent bone volume (%)	BV/TV	91.53	0.27	7.01±7.41	6.08±2.03	3.50±0.09	20.80±4.06
Trabecular thickness (mm)	Tb.Th	0.3	0.09	0.14	0.14	0.12	0.25
Trabecular separation (mm)	Tb.Sp	0.12	0.34	0.35	0.33	0.34	0.34

[171]

[172] 즉, 줄기세포에 PTEN을 도입시키면, in vivo 에서 줄기세포의 조직 재생능이 증가되고, 특히 계대 배양 횟수 증가에 따라 감소되는 조직 재생능을 이전 계대 배양 상태로 회복 또는 이전 계대 배양 상태보다 조직 재생능을 강화시켜 주는 것을 알 수 있다.

[173]

[174] **실시예 12: pPTEN 도입 지방 유래 줄기세포의 세포막 항원 및 염색체 분석**

[175] PTEN의 도입이 3.50±0.09의 세포막 마커 및 염색체에 어떠한 영향을 미치는지 확인하고자 하였다.

[176] 먼저, pPTEN을 도입하거나 도입하지 않은 P6의 ASC를 트립신 처리한 후 이하 세포 막 항원들에 대한 항체들과 함께 얼음에서 인큐베이션 하였다. : CD29, CD44, CD90, CD105 (중간엽 줄기세포 마커), CD14, CD34, CD45 (조혈 줄기세포 마커), CD31 (내피세포 마커). 모든 항체는 Becton Dickinson Biosciences (NJ)에서 구입하였다. 염색은 플루오레세인이소티오시안산염(fluorescein isothiocyanate, FITC) 또는 피코에리트린(phycoerythrin, PE)가 접합된 2차 항체(Becton Dickinson Biosciences, NJ)를 이용하였고, 형광-활성 세포 분석기 (fluorescence-activated cell sorter) 기계를 이용하여 분석하였다. 데이터는 WinMDI 2.8 소프트웨어를 이용하여 분석하였다.

[177] 또한, 세포가 2배체로 제대로 존재하는지 확인하기 위해 pPTEN을 도입하거나 도입하지 않은 ASC(P6, P12)를 콜세미드(colcemide)를 이용하여 유사분열 중기 정지를 일으켰다. 이들을 트립신 처리로 수확한 후, 0.075 M KCl의 저장액으로 삼투압 충격을 주고, 3:1 메탄올/아세트산의 고정액으로 고정하였다. 염색체분석은 김자분염법(G-banding)을 통해 수행하였다.

[178] 그 결과, pPTEN을 도입한 ASC의 세포막에 대한 면역표현형 분석을 통해 pPTEN을 도입하거나 도입하지 않은 세포 모두 중간엽줄기세포 마커(CD29, CD44, CD90, 및 CD105)에 대해서는 양성, 조혈줄기세포 마커(CD14, CD34 및 CD45)에 대해서는 음성, 내피세포 마커(CD31)에 대해서도 음성을 보이는 것을 확인하였다(도 14a). 따라서 pPTEN을 도입한 ASC의 세포막 항원의 패턴은 도입하지 않은 세포와 면역학적으로 아무런 차이를 보이지 않는 것을 확인했다.

이는 pPTEN을 도입한 ASC가 세포막 항원을 평상시 그대로 유지한다는 것을 의미한다. 염색체 분석은 6계대와 12계대의 pPTEN을 도입하거나 도입하지 않은 ASC에 대하여 행해졌다. 모든 세포는 이배체를 유지하고 있었으며, 아무런 염색체이상을 보이지 않았다(도 14b).

[179]

청구범위

[청구항 1] PTEN 유전자 또는 PTEN을 포함하는, 줄기세포의 조직 재생능 강화용 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 조직 재생 지지체 상에 분주된 줄기세포의 조직 재생능을 개선 또는 이전 계대 배양 상태로 회복시키는 것인 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 줄기세포는 성체 줄기세포인 것인 조성물.

[청구항 4] 줄기세포에 PTEN 유전자 또는 PTEN을 도입하는 단계를 포함하는, 조직 재생능이 강화된 줄기세포의 제조 방법.

[청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 줄기세포는 성체 줄기세포인 것인 방법.

[청구항 6] 플라스미드 PTEN 및 PTD의 콘쥬게이트, 및 줄기세포를 포함하는 조직 재생용 키트.

[청구항 7] 제6항에 있어서, 조직 재생 지지체를 추가로 포함하는 것인 조직 재생용 키트.

[청구항 8] 줄기세포가 부착된 조직 재생 지지체를 조직 재생이 필요한 부위에 적용시키는 단계를 포함하는 조직 재생방법으로서, 상기 줄기세포는 PTEN 유전자 또는 PTEN이 도입된 것인 조직 재생방법.

[청구항 9] PTEN 유전자 또는 PTEN을, 체외에서(in vitro) 계대 배양된 줄기세포에 도입하는 단계를 포함하는, 줄기세포를 이전 계대 배양 상태로 회복시키는 방법.

[청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 방법은 줄기세포의 계대 배양 횟수 증가에 따라 나타나는 줄기세포 내 노화 관련 β-갈락토시다아제 발현 증가, 줄기세포의 크기 증가, 줄기세포의 증식률 감소, 증식기간 감소, 텔로머라아제 활성 감소, 또는 줄기세포의 분화능 감소를 이전 계대 배양상태로 회복시키는 것인 방법.

[청구항 11] 제9항에 있어서, 상기 줄기세포는 성체 줄기세포인 것인 방법.

[청구항 12] PTEN 유전자 또는 PTEN을 포함하는, 줄기세포의 회춘 조성물(rejuvenating composition)로서, 시험관에서(in vitro) 줄기세포의 계대 배양 횟수 증가에 따라 나타나는 줄기세포 내 노화 관련 β-갈락토시다아제 발현 증가, 줄기세포의 크기 증가, 줄기세포의 증식률 감소, 증식기간 감소, 텔로머라아제 활성 감소, 또는 줄기세포의 분화능 감소로 나타나는 노화진행을 역방향으로 진행시키는 것인 조성물.

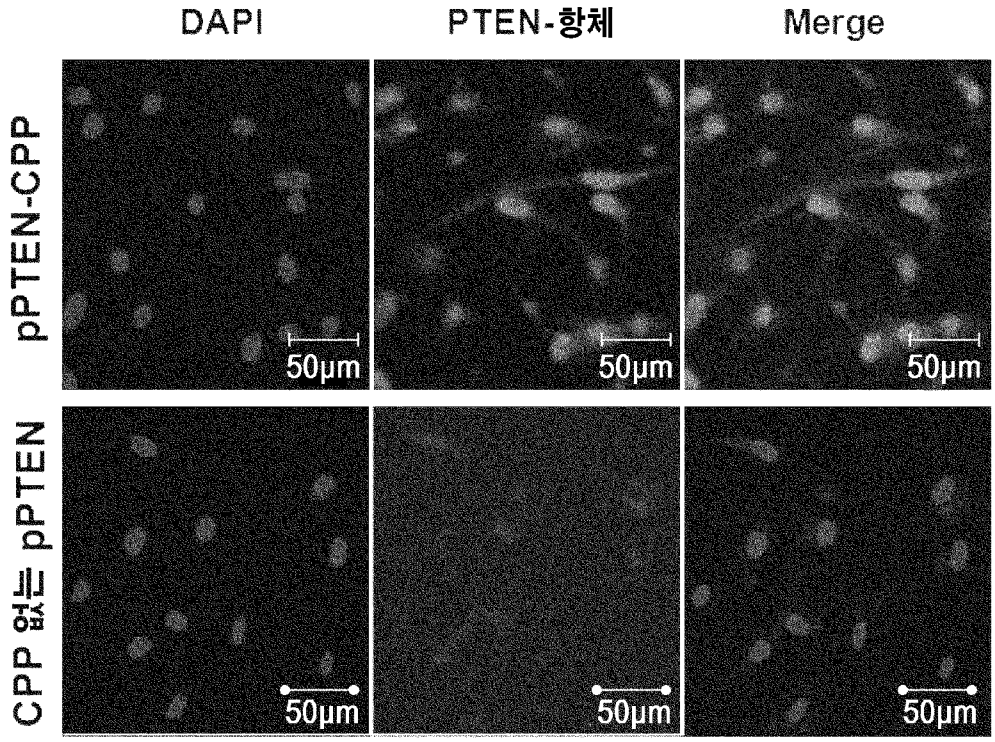
[청구항 13] PTEN 유전자 또는 PTEN을 줄기세포에 도입하는 단계를 포함하는, 줄기세포의 노화 지연방법으로서, 상기 노화는 체외에서(in vitro) 줄기세포의 계대 배양 횟수 증가에

따라 나타나는 줄기세포 내 노화 관련 β-갈락토시다아제 발현 증가, 줄기세포의 크기 증가, 줄기세포의 증식률 감소, 증식기간 감소, 텔로머라아제 활성 감소, 또는 분화능 감소인 것인 방법.

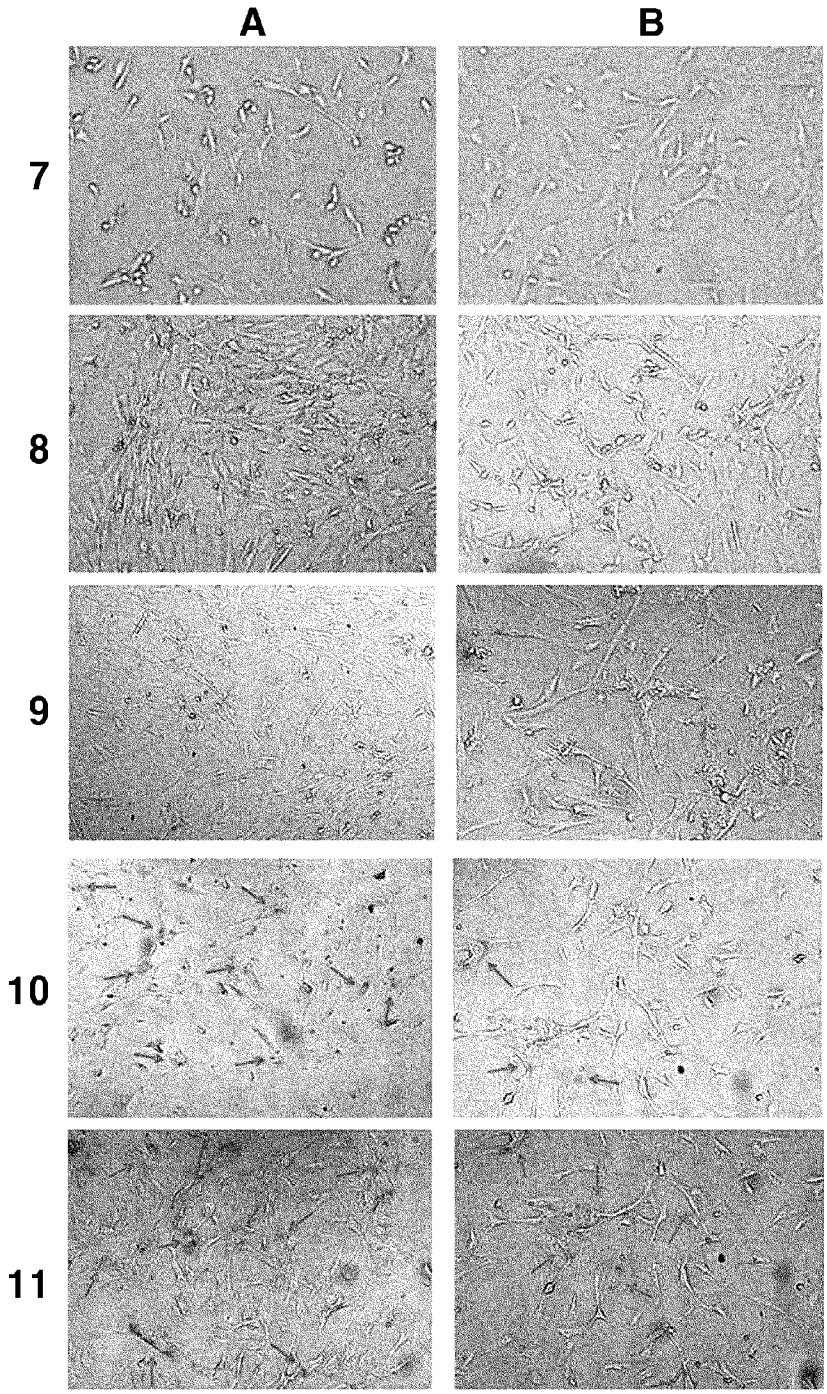
[청구항 14] 제13항에 있어서, 상기 줄기세포는 성체 줄기세포인 것인 방법.

[청구항 15] PTEN 유전자 또는 PTEN을 포함하는, 줄기세포의 노화 지연용 조성물로서,
상기 노화는 체외에서(in vitro) 줄기세포의 계대 배양 횟수 증가에 따라 나타나는 줄기세포 내 노화 관련 β-갈락토시다아제 발현 증가, 줄기세포의 크기 증가, 줄기세포의 증식률 감소, 증식기간감소, 텔로머라아제 활성 감소, 또는 분화능 감소인 조성물.

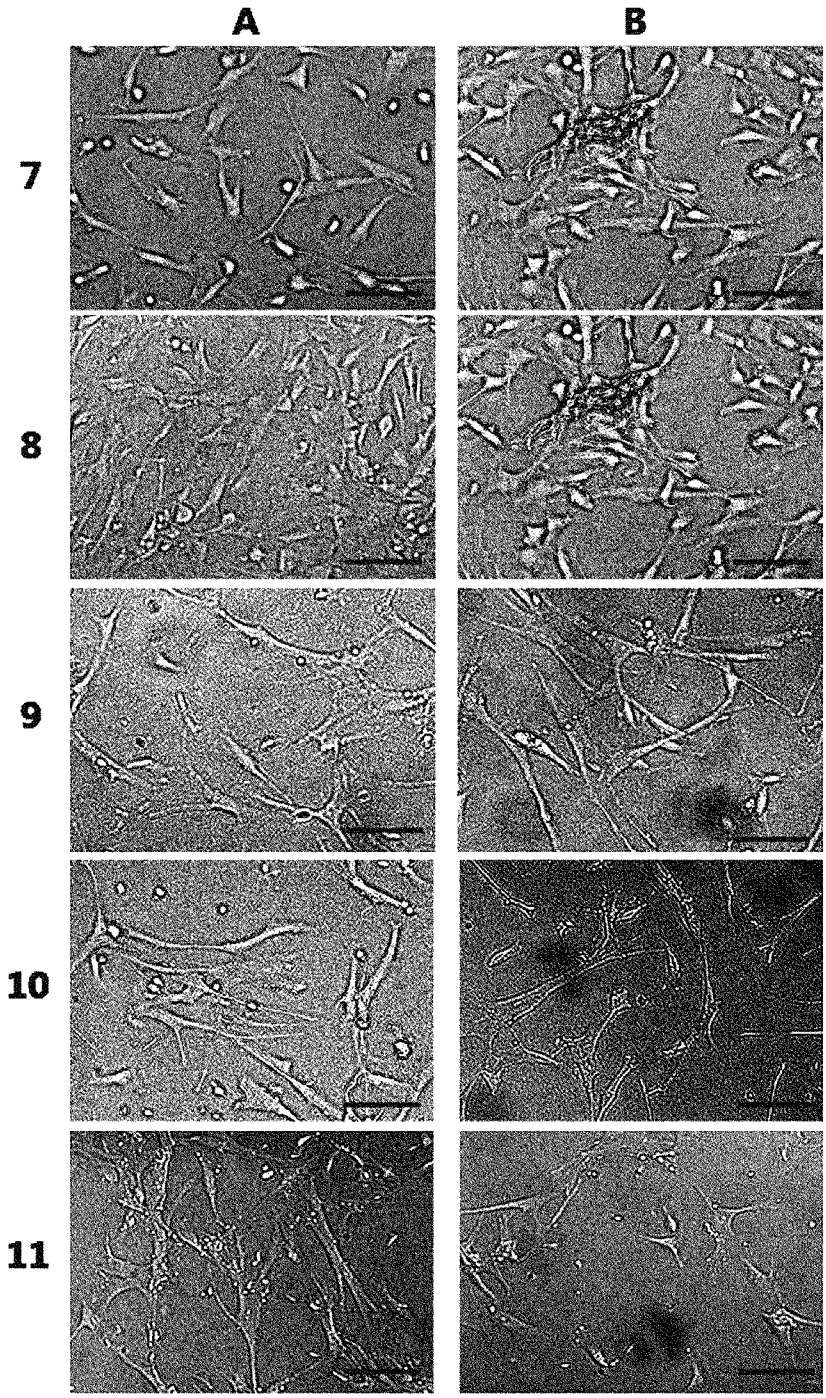
[Fig. 1]


DAPI
PTEN-항체
Merge
pPTEN-CPP
CPP 없는 pPTEN
50μm
50μm
50μm
50μm
50μm
50μm

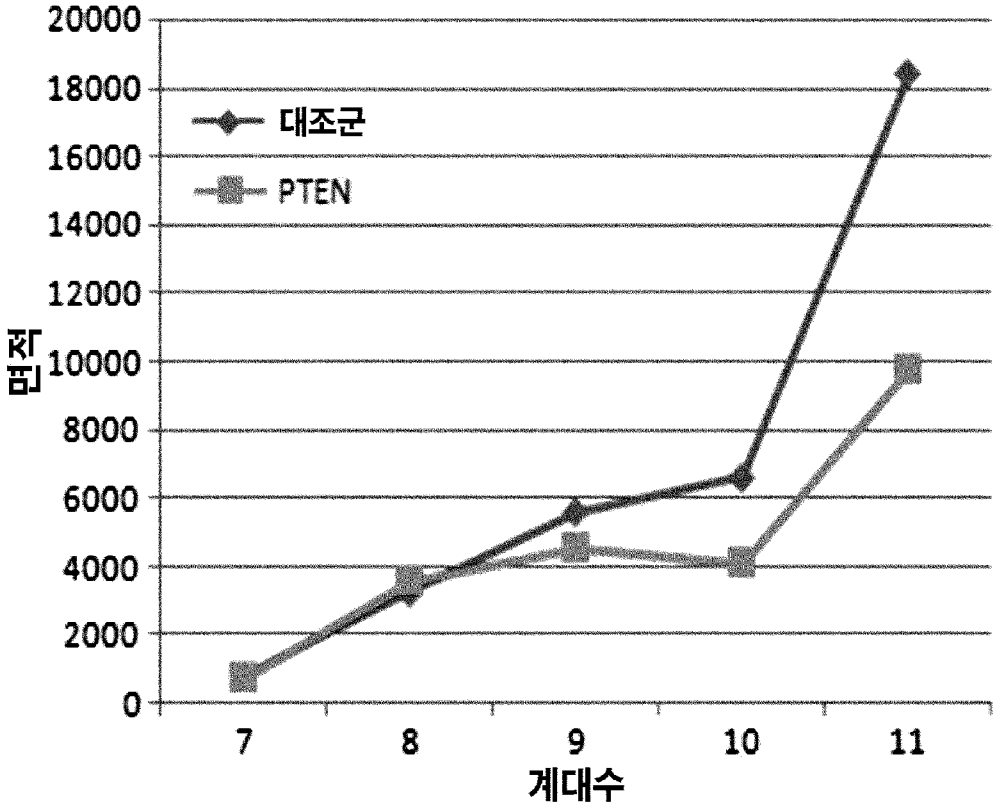
[Fig. 2]



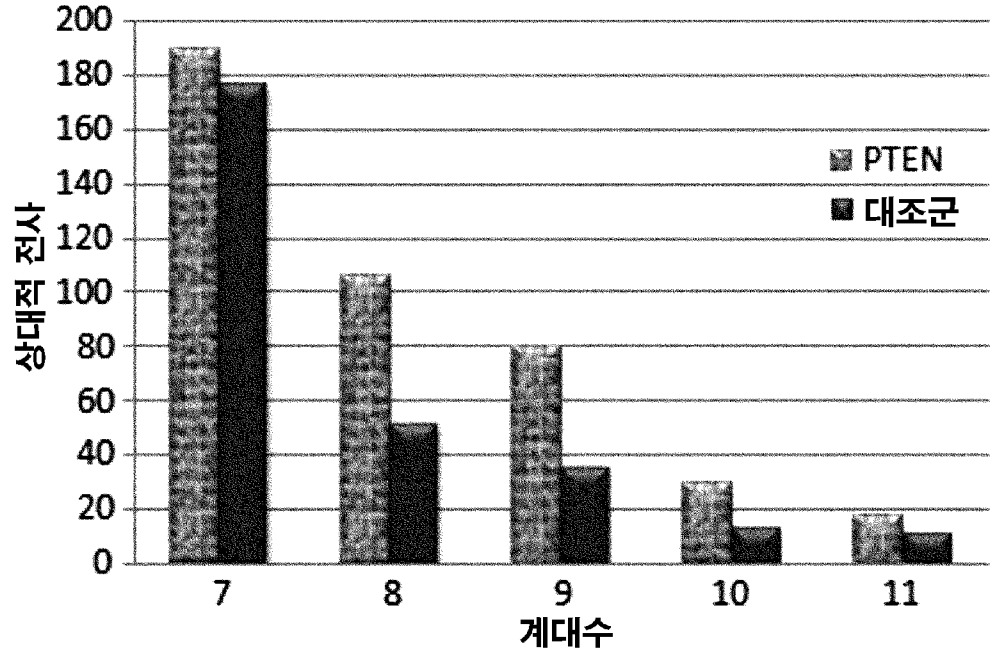
[Fig. 3]



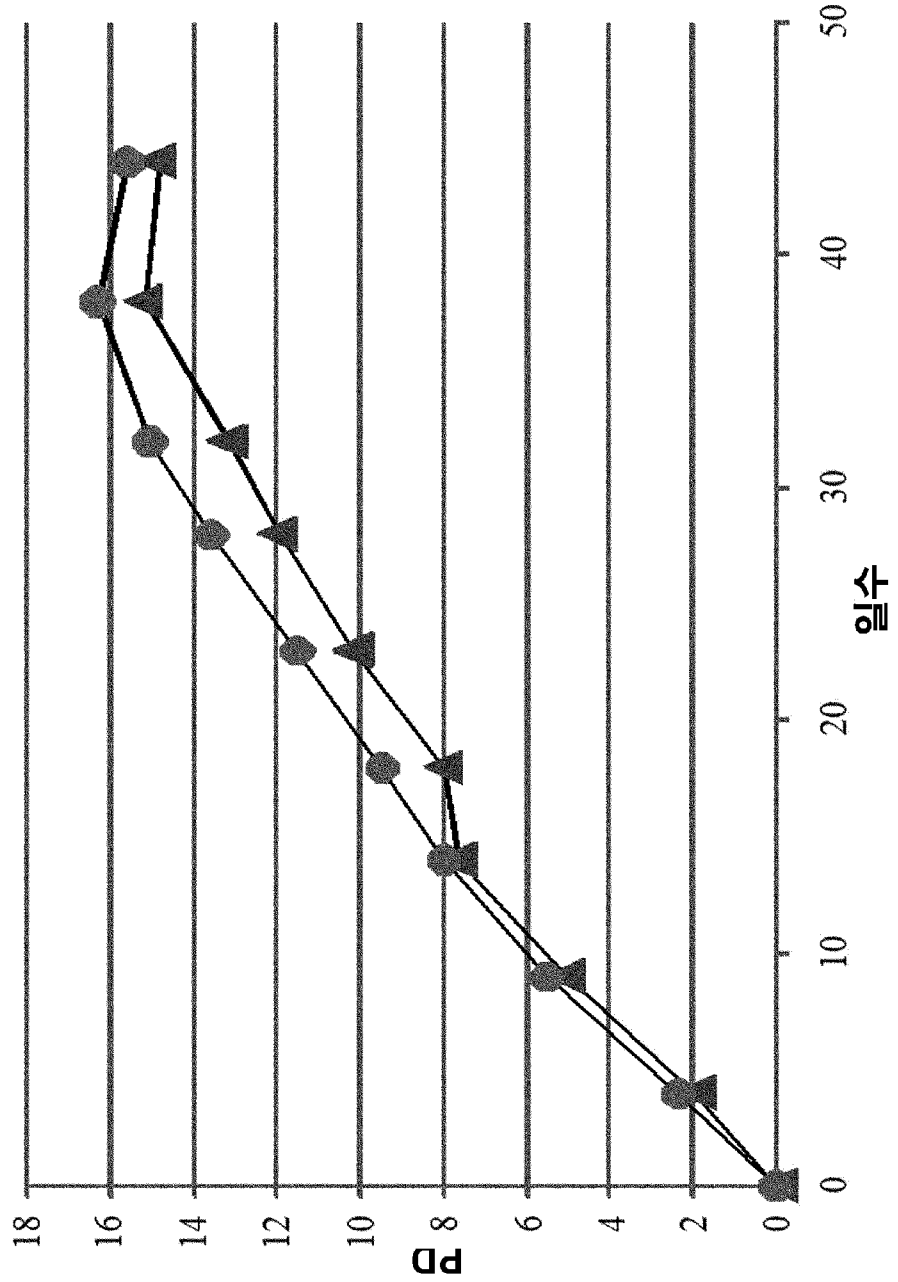
[Fig. 4]


20000
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
면적
대조군
PTEN
7
8
9
10
11
계대수

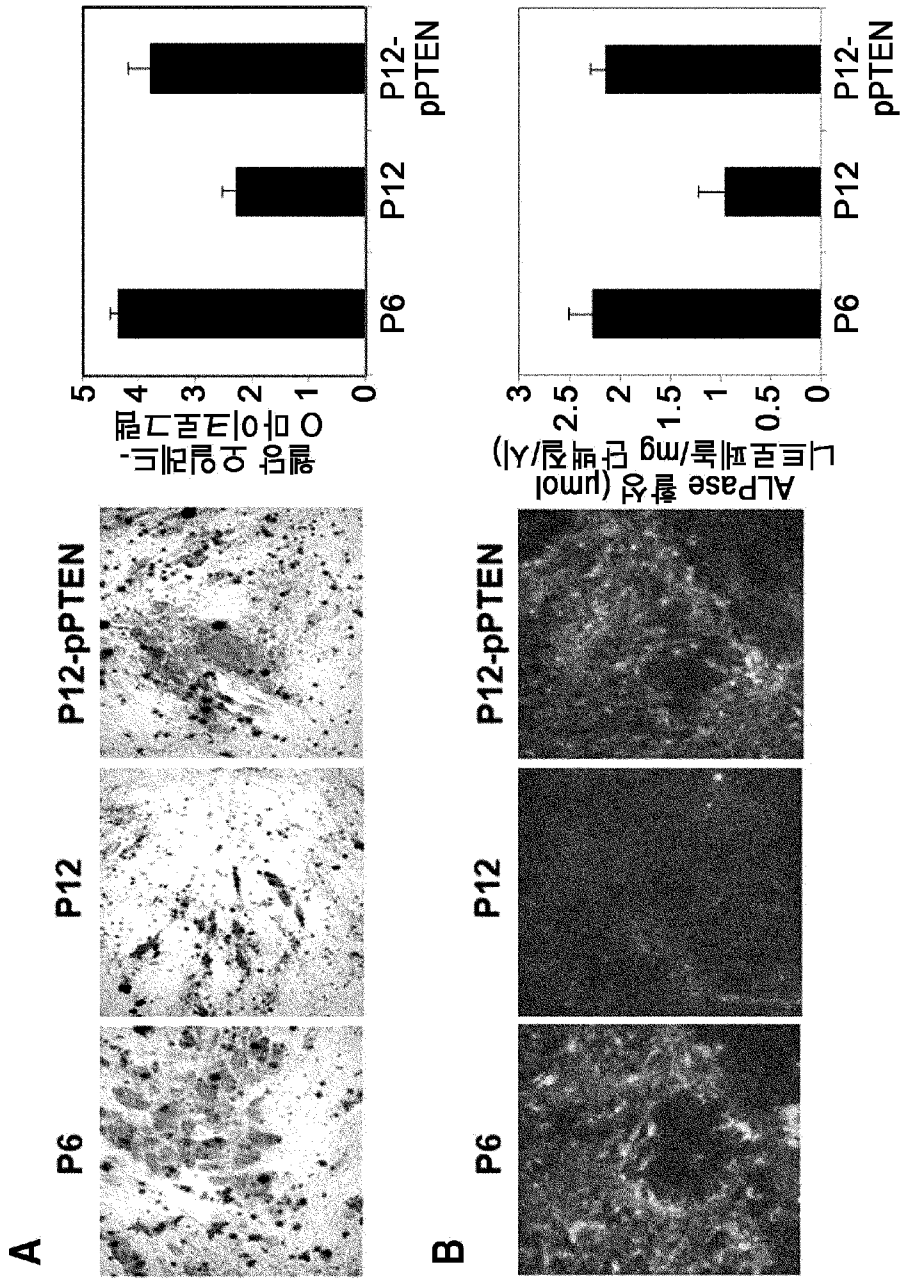
[Fig. 5]


200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
상대적 전사
PTEN
대조군
7
8
9
10
11
계대수

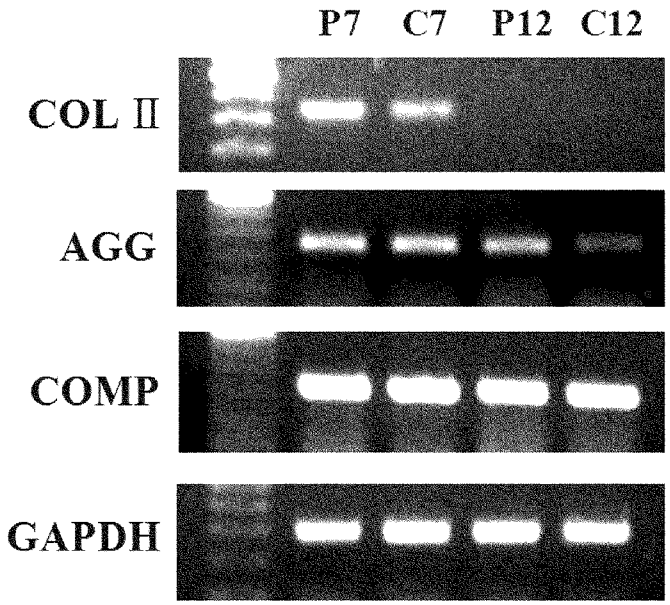
[Fig. 6]



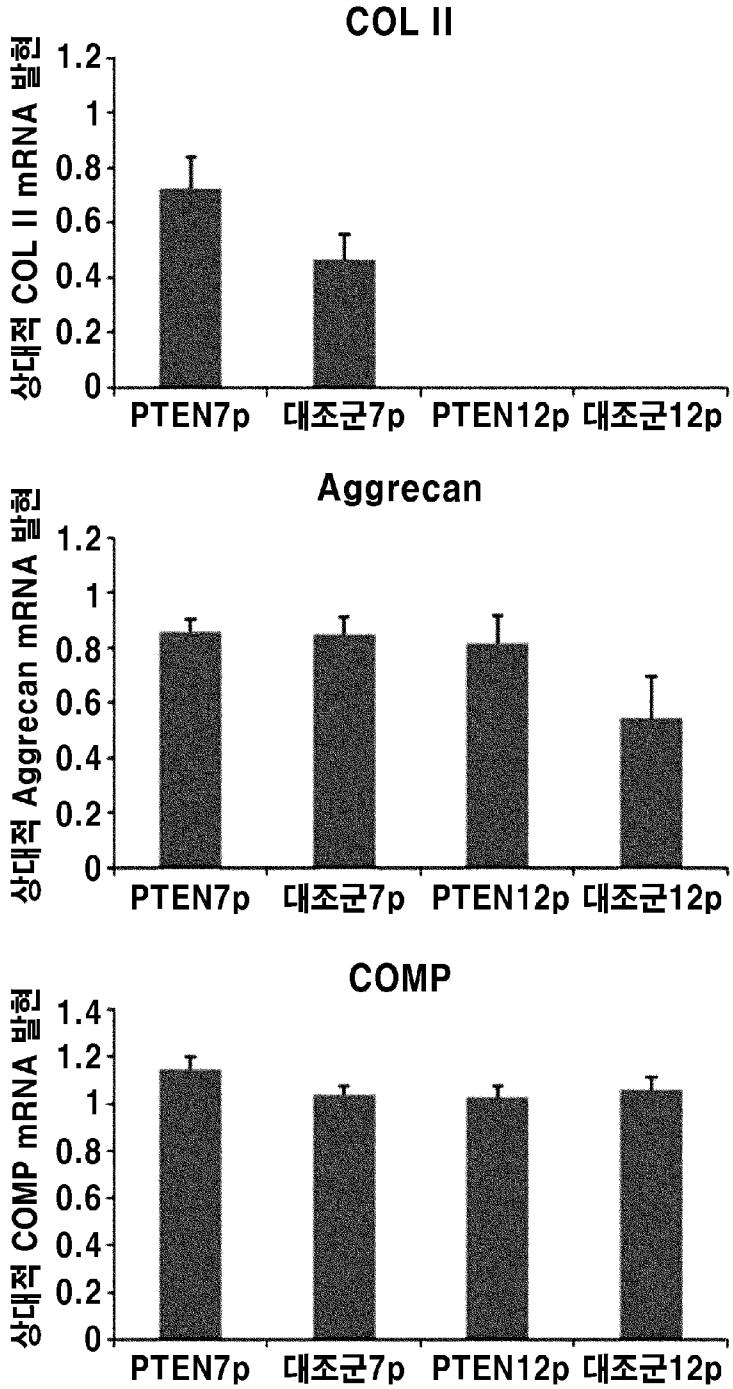
[Fig. 7]


A
B
P6
P12
P12-pPTEN
ALPase 활성 (μmol 니트로페놀/mg 단백질/시)
0
1
2
3
0.5
1.5
2.5
알칼리 오일레드-O 마이크로그램
4
5

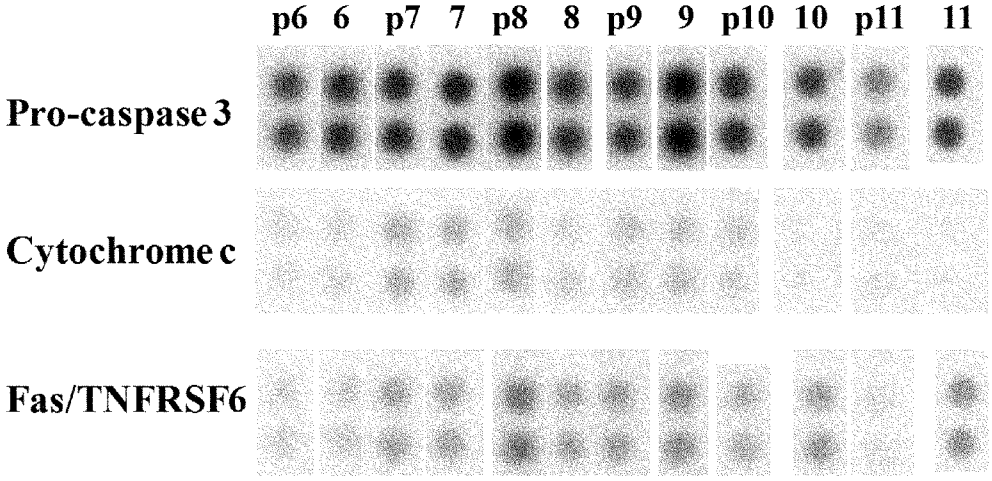
[Fig. 8]


P7
C7
P12
C12
COL Ⅱ
AGG
COMP
GAPDH

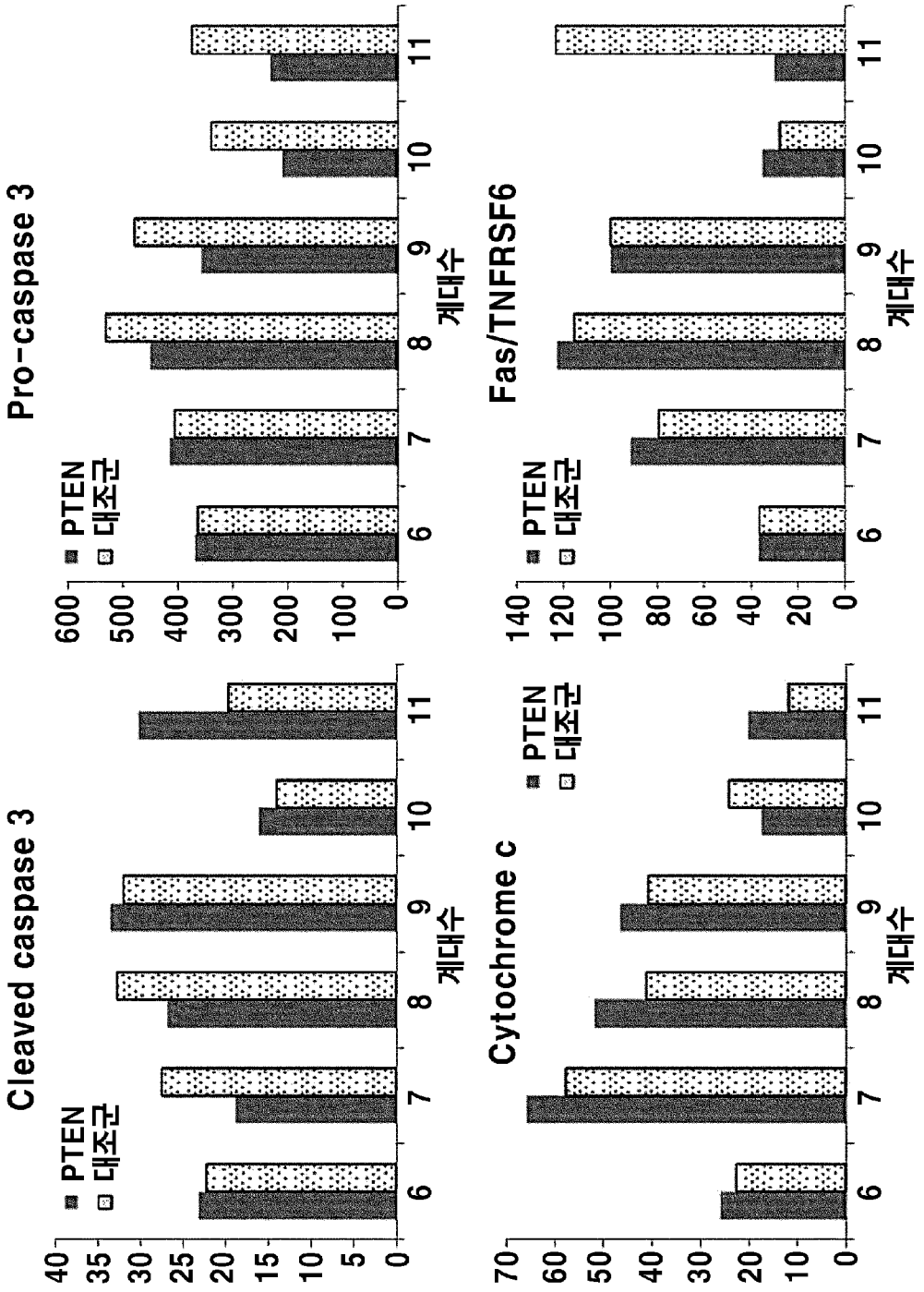
[Fig. 9]


COL II
상대적 COL II mRNA 발현
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
PTEN7p
대조군7p
PTEN12p
대조군12p
Aggrecan
상대적 Aggrecan mRNA 발현
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
PTEN7p
대조군7p
PTEN12p
대조군12p
COMP
상대적 COMP mRNA 발현
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
PTEN7p
대조군7p
PTEN12p
대조군12p

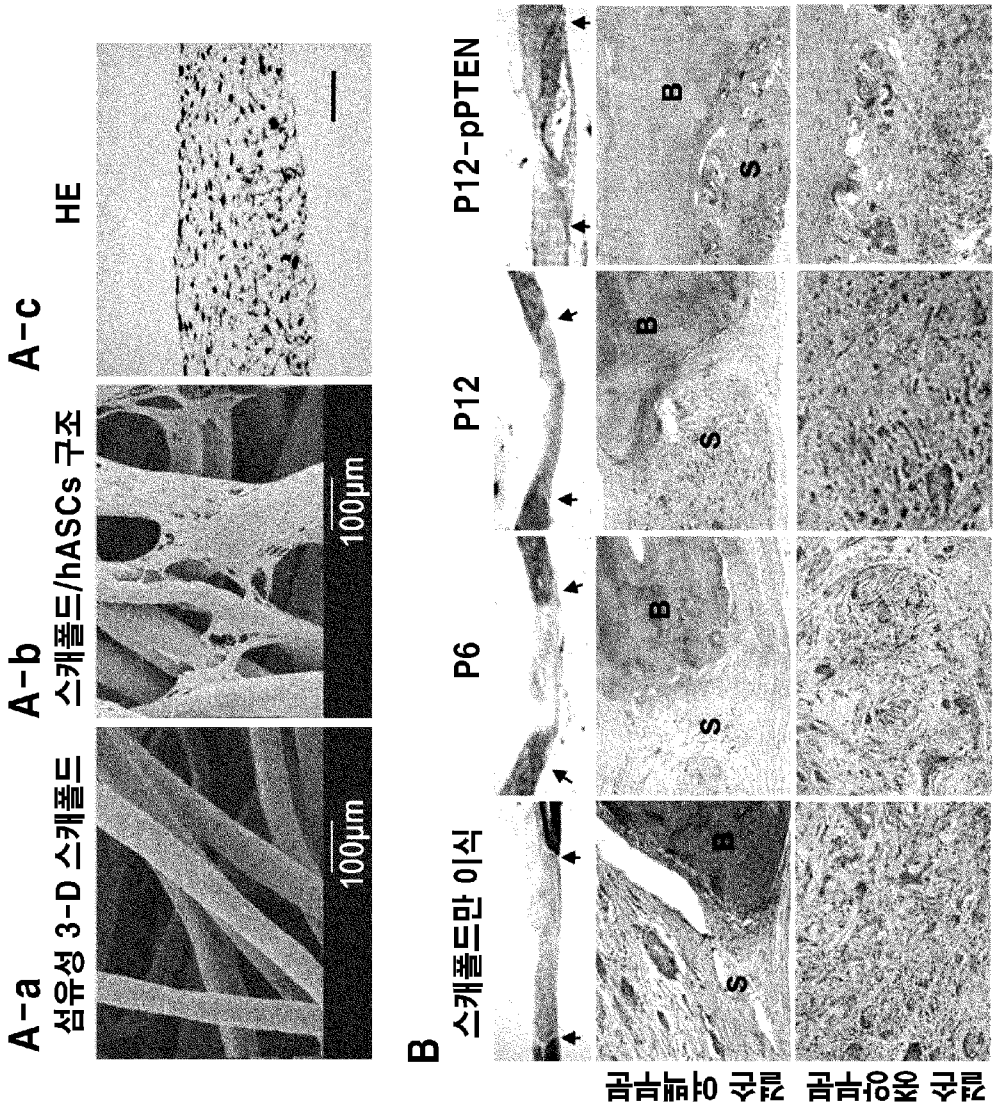
[Fig. 10]


p6
6
p7
7
p8
8
p9
9
p10
10
p11
11
Pro-caspase 3
Cytochrome c
Fas/TNFRSF6

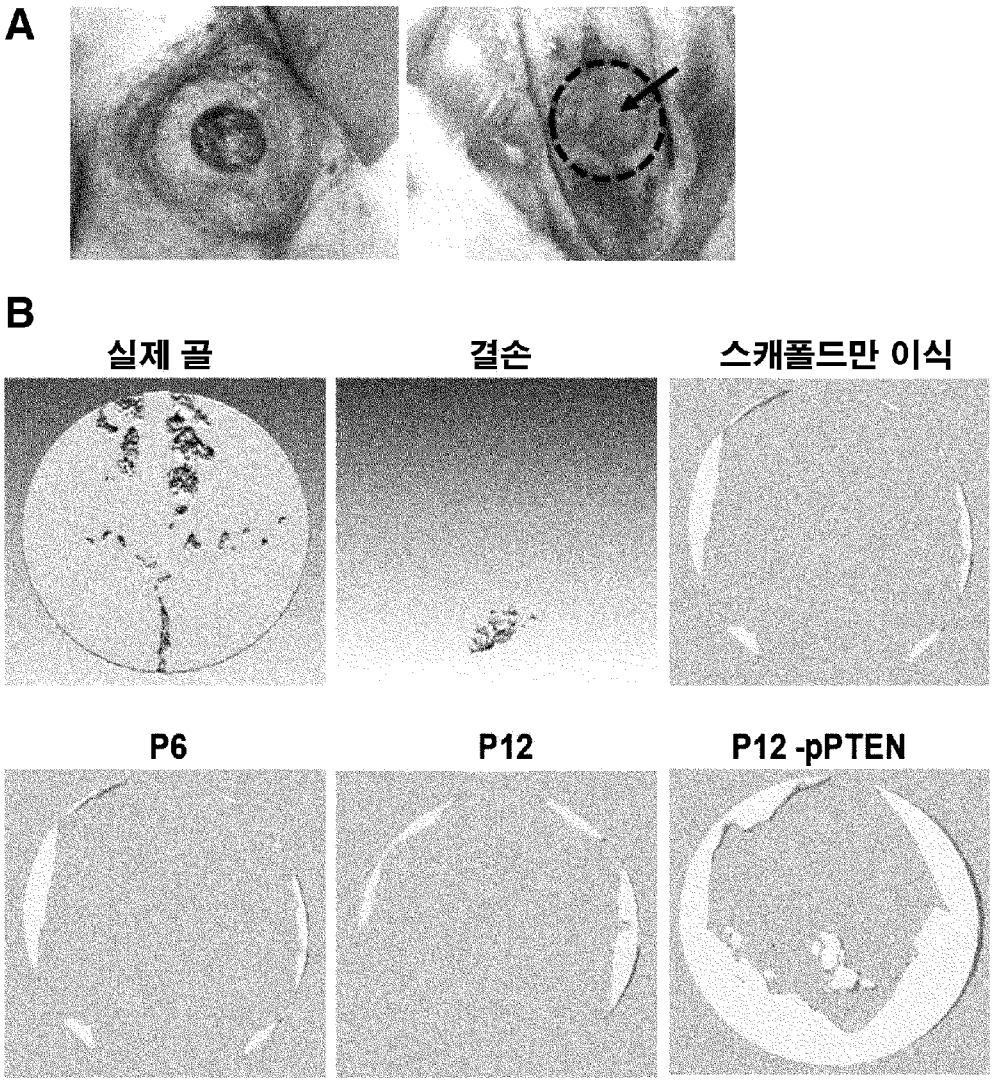
[Fig. 11]


Pro-caspase 3
Fas/TNFRSF6
Cleaved caspase 3
Cytochrome c
PTEN
대조군
계대수
600
500
400
300
200
100
0
140
120
100
80
60
40
20
40
35
30
25
20
15
10
5
70
6
7
8
9
10
11

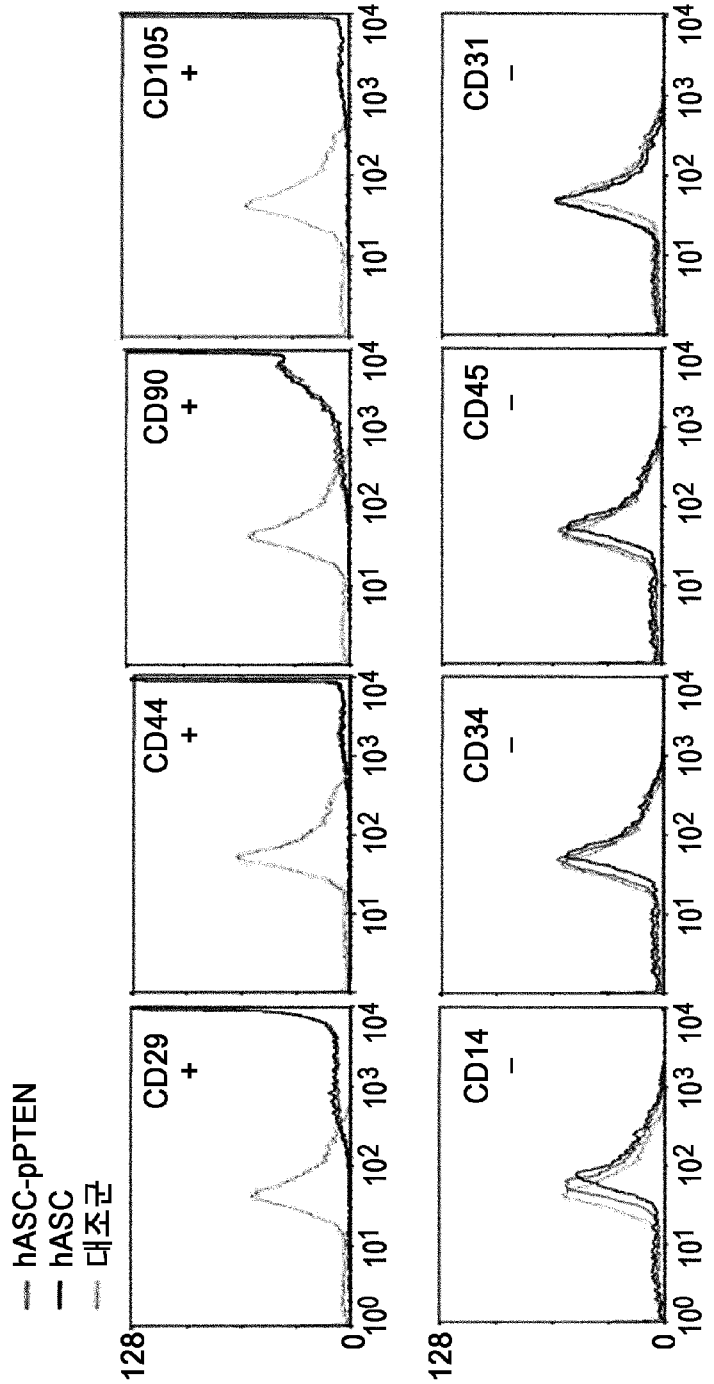
[Fig. 12]


A-a
섬유성 3-D 스캐폴드
100μm
A-b
스캐폴드/hASCs 구조
100μm
A-c
HE
B
스캐폴드만 이식
P6
P12
P12-pPTEN
B
S
결손 연골부분
결손 연골부분

[Fig. 13]



[Fig. 14a]


hASC-pPTEN
hASC
대조군
CD29 +
CD44 +
CD90 +
CD105 +
CD14 −
CD34 −
CD45 −
CD31 −
128
0
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4

[Fig. 14b]

